

**TPPP, EGY ÚJ FEHÉRJE CSALÁD:**  
***HOMOLÓG SZEKVENCIÁK ELTÉRŐ SZERKEZETI ÉS FUNKCIONÁLIS***  
***SAJÁTSÁGOKKAL***

**Vincze Orsolya**



**Eötvös Loránd Tudományegyetem**

**Biológia Doktori Iskola (Iskolavezető: Dr. Erdei Anna)**

**Molekuláris sejt- és neurobiológia doktori program (Programvezető: Dr. Sass Miklós)**

**Témavezető: Dr. Ovádi Judit, D. Sc. Habil.**

**Tudományos tanácsadó**

**Magyar Tudományos Akadémia**

**Szegedi Biológiai Központ**

**Enzimológiai Intézet**

**Budapest, 2011**

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések .....	4
Bevezetés .....	6
Irodalmi áttekintés .....	8
<i>A mikrotubulusok szerkezete, szerepe</i> .....	8
<i>A TPPP/p25</i> .....	11
<i>A TPPP/p25 egy feltételezett új fehérjecsald első izolált tagja</i> .....	14
<i>Rendezetlen fehérjék</i> .....	14
<i>Rendezetlen fehérjék szerepe a neurodegenerációs betegségekben</i> .....	16
Anyagok és módszerek .....	18
<i>Fehérjepreparálás</i> .....	18
<i>Fehérjekoncentráció meghatározása</i> .....	19
<i>Citoszolikus agyextraktum készítése</i> .....	20
<i>Limitált proteolízis</i> .....	20
<i>Affinitáskromatográfia</i> .....	21
<i>Western-blot analízis</i> .....	22
<i>Cirkuláris Dikroizmus (CD) mérések</i> .....	22
<i>Turbiditásmérés</i> .....	23
<i>Szedimentáció</i> .....	23
<i>Rendezetlen régiók jóslása</i> .....	23
<i>SM betegek leírása</i> .....	24
<i>ELISA</i> .....	25
<i>Pepscan analízis</i> .....	25
Eredmények és megvitatásuk .....	27
I. A TPPP fehérjecsald szerkezeti és funkcionális jellemzése .....	27
<i>Szekvencia összehasonlítás</i> .....	27
<i>A TPPP fehérjék szerkezeti tulajdonságainak összehasonlítása</i> .....	31
1. A TPPP fehérjék szerkezetének jóslása különböző módszerekkel.....	31
2. A rendezetlenség kísérleti kimutatása.....	35
<i>Funkcióbeli különbségek</i> .....	43
II. Kölcsönható partnerek feltérképezése .....	48

<i>Affinitáskromatográfiás vizsgálatok</i>	49
<i>GAPDH</i>	52
<i>MAP kináz I</i>	55
<i>Kalmodulin</i>	57
<i><math>\alpha</math>-szinuklein</i>	1
<i>Mielin bázikus fehérje</i>	60
III. Fehérje-fehérje kötő domének keresése .....	65
<i>Tubulin kötő régió azonosítása a TPPP/p25 fehérjén</i>	66
<i>TPPP/p25 kötő régió azonosítása a MT-on</i>	69
<i><math>\alpha</math>-szinuklein kötő régió a TPPP/p25-on</i>	1
<i>TPPP/p25 kötő régió azonosítása az <math>\alpha</math>-szinukleinen</i>	72
Összefoglalás .....	76
Summary .....	77
A dolgozat alapját képező publikációk: .....	78
Köszönetnyilvánítás .....	83
Irodalomjegyzék .....	79

## RÖVIDÍTÉSEK

### Enzimek, fehérjék:

BSA	szarvasmarha szérum albumin
CaM	kalmódulin
cdk5	ciklin-dependens kináz 5
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
IUP	rendezetlen fehérje (intrinsically unstructured protein)
MAP	mikrotubulushoz asszociált fehérje (Microtubule Associated Protein)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (más néven Erk)
MBP	mielin bázikus fehérje
MT	mikrotubulus
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
TPPP	tubulin polimerizációt elősegítő fehérje (Tubulin Polymerization Promoting Protein)

### Módszerek

CD	Cirkuláris dikroizmus
DSC	Differenciál pásztaó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry)
MS	Tömegspektroszkópia (Mass Spectrometry)
NMR	Mágneses magrezonancia

### Anyagok

ANSA	1-anilinoftalin-8-szulfonsav
DTE	1,4-ditioeritriol
EGTA	etilén-glikol-bisz(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
MES	2-(N-morfolino)-etánszulfonsav
NAD <sup>+</sup>	nikotinsavamid- adenin-dinukleotid
PIPES	piperazin-N,N'-bisz(etánszulfonsav)
TFE	trifluoretanol
tricin	N-[Tris(hidroximetil)metil]glicine

Tris	trisz(hidroximetil)aminometán
Betegségek	
PD	Parkinson kór
AD	Alzheimer kór
MSA	Multiszipisztémás atrófia
DLBD	Diffúz Lewy-testes betegség
SM	Szklerózis Multiplex
Egyéb	
MTOC	Mikrotubulus organizáló centrum

## BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek vázának egyik fő alkotóeleme a tubulin heterodimerekből álló mikrotubulus (MT), mely a sejten belül igen sokrétű feladatot lát el. A váz-funkció mellett szerepe van a sejten belüli transzportban, a sejt mozgásában és a sejt osztódásában is. Mindezeket a különböző funkciókat nem egyedül, hanem egy finoman hangolt rendszer részeként, sokféle fehérjével kölcsön hatva tölti be. A MT-hoz kötődő fehérjék legjellemzőbb és legismertebb csoportja az ún. Mikrotubulushoz Asszociált Proteinek (MAP-ek), melyek igen különbözőek lehetnek. Például stabilizálják/destabilizálják a MT-okat, vagy a MT-ok szupramolekuláris szerkezetét befolyásolják, esetleg segítik a MT mentén lejátszódó transzportfolyamatokat. Azonban a jól ismert strukturális és motor MAP-ek mellett a mikrotubuláris rendszer szabályozásához igen fontosak a MT-okkal dinamikus kölcsönhatásokat létesítő ún. oldható, citoplazmatikus fehérjék, melyek csak átmenetileg kötődnek a MT-okhoz.

Ilyen citoplazmatikus fehérje a nemrégiben felfedezett TPPP/p25 (Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25) is, melynek a mikrotubuláris rendszerre kifejtett hatását az Enzimológiai Intézetben fedezték fel Dr. Ovádi Judit kutatócsoportjában. Leírták, hogy a TPPP/p25 legnagyobbbrészt az agyban előforduló fehérje, amely kölcsön hat a tubulinnal: *in vitro* aberráns MT képződést indukál, valamint kötegetli a taxollal stabilizált MT-okat (1). Több olyan tulajdonságát is kimutatták a TPPP/p25-nek, (hőstabilitás, magas pI, az aminosav sorrend alapján jóval sokkal alacsonyabb  $\alpha$ -hélix tartalom) amelyek arra utaltak, hogy a TPPP/p25 is a rendezetlen fehérjék közé sorolható (1, 2).

Megállapították továbbá, hogy a TPPP/p25 egy új fehérjecsalád első tagjának tekinthető, mert az elsődleges szerkezete különbözik minden addig izolált fehérje szerkezetétől, viszont hasonlóságot mutat több, TPPP/p25-szerű, hipotetikus fehérjével is (2).

*In vivo* immunhisztokémiai és konfokális mikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a TPPP/p25 feldúsul az  $\alpha$ -szinuklein tartalmú Lewy-testekben a Parkinson kór és a Diffúz Lewy-testes betegség esetében, valamint a kialakuló gliális zárványokban a Multiszipisztémás atrófia esetén, ami felveti a TPPP/p25 szerepét a szinukleinopátiák patogenezisében (3).

Doktori munkám elsődleges célja a TPPP/p25 minél átfogóbb megismerése volt, ezen belül is a fehérje szerkezeti és funkcionális sajátosságainak molekuláris szintű jellemzése, valamint fiziológiás és esetlegesen patológias szerepének vizsgálata volt.

Ennek érdekében először is szerettem volna megvizsgálni, hogy az adatbázisok tanúsága szerint a TPPP/-p25-el nagyfokú szekvenciális hasonlóságot mutató TPPP/p25-szerű fehérjék konkrét, szerkezeti-, ill. funkcionális tulajdonságaiban mennyire érhető tetten ez a hasonlóság. Egy fehérje funkciójának megértéséhez kiemelten fontos, hogy megismerjük, vajon milyen fehérjékkel áll kölcsönhatásban a sejtben. Ezért a TPPP/p25 kölcsönható partnereinek feltérképezését is célul tűztem ki. Az azonosított kölcsönható partnerek esetében a kölcsönhatásokat további *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel is terveztem jellemezni, hogy ez által minél pontosabban megérthessük a kölcsönhatások fiziológiás illetve patológias funkcióit. Célom volt meghatározni továbbá, hogy a TPPP/p25 mely régiója tehető felelőssé a különböző kölcsönható partnerekhez, első sorban a tubulinhoz, valamint egyéb ismert, vagy a munka során ismertté váló fehérjékhez való kötődésért, hogy később ezen ismeretek birtokában képessé váljunk a kialakuló kölcsönhatások szelektív befolyásolására. Vizsgálataim hozzájárulnak egy új fehérjecsalád, a TPPP fehérjék fiziológiás és patológias szerepének tisztázásához, valamint eredményeim példát adnak arra, hogy a homológ szekvencia önmagában mennyire alkalmas a fehérjék szerkezetének és tulajdonságainak előrejelzésére. Ezen kívül a kötő domének ismerete potenciális gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztéséhez szolgáltat információt.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### A mikrotubulusok szerkezete, szerepe

#### *Az eukarióta sejtek citoszkéletális hálózata*

Az eukarióta sejtek jellegzetes szerkezeti eleme az intracelluláris váz, más néven citoskeleton, mely három filament rendszerből épül fel. Ezek az aktinváz, az intermedier filament és a mikrotubuláris rendszer. Ezen rendszereknek részben átfedő, részben jellegzetes, egyedi funkciójuk van. Az intermedier filamentumok szerepe a mechanikai szilárdság biztosítása. Az aktinváz az alak-, és helyváltoztató mozgások kivitelezéséért, valamint a sejt alakjának fenntartásáért felelős. Végül a MT-ok tartják fenn a sejt belső rendezettségét, a sejtmag és az organellek jellegzetes elhelyezkedését. Ők teszik lehetővé a hozzájuk kapcsolódó motorfehérjék segítségével az egyes sejtszervek közötti szállítást, a kromoszómák szegregációját a sejtosztódás során, azaz általában a belső átrendeződést eredményező mozgásokat. Mindhárom vázelem közös funkciója továbbá, hogy az intracelluláris membránokkal összemérhető, hatalmas hordozófelületet alkotnak, melyhez számos makromolekula képes kötődni (pl.: enzimek, nukleinsavak) (4). Ezeknek a kötődéseknek, heteroasszociációknak egy része statikus, szoros kölcsönhatásokon alapszik, más részük dinamikus, azaz a sejt metabolikus állapota által meghatározott körülményektől függ. Ezt a komplex, fehérjéket és vázelemeket tartalmazó citoszkéletális struktúrát nevezték el „microtrabecular lattice”-nek (5).

#### *A tubulin*

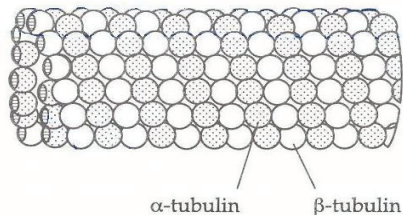
A tubulin szupercsalád 6 különböző családra osztható fel, ezek közül a legelterjedtebb és a legjelentősebb az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin, ill. az ezekből felépülő heterodimer fehérje, amely az eukarióta sejtekben a MT-ok fő alkotóeleme. A szupercsalád következő tagja, a  $\gamma$ -tubulin szintén megtalálható minden eukarióta sejtben: az ún. mikrotubuláris organizáló centrumokban (MTOC) a mikrotubulusok összeszerelésében játszik szerepet, sejtosztódáskor pedig a mitotikus orsó kialakulásában. A szupercsalád további tagjairól sokkal kevesebb ismeret áll rendelkezésre. A különböző izotípusok helyettesíthetik egymást *in vitro*, de *in vivo* szövetspecifitás figyelhető meg.



A különböző eukarióta élőlényekből származó  $\beta$ -tubulin szekvenciák nagyfokú hasonlóságot mutatnak, az azonosság körülbelül 60%. Ez a konzerváltság a fehérjék térszerkezeti hasonlóságában még inkább kimutatható (6). A másodlagos szerkezetben jellegzetes  $\alpha$ -helikális és  $\beta$ -redős elrendeződés figyelhető meg, melyek aránya hasonló az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -tubulinban, így rendkívül hasonló térszerkezet alakul ki a két alegységben. Ennek következtében stabil kapcsolat alakulhat ki közöttük (7). Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin alegységek egy-egy GTP-t kötnek. A  $\beta$ -tubulinnak GTP-áz aktivitása is van, míg az  $\alpha$ -tubulinnak nincs.

### A mikrotubulus

A polimerizáció során a tubulin-heterodimerek szigorúan fej-farok elrendeződésben összekapcsolódnak és fonalszerű struktúrákba, ún. protofilamentumokba szerveződnek. 13 protofilamentum laterálisan egymáshoz illeszkedik oly módon, hogy egymáshoz képest mintegy 0,9 nm-rel el vannak csúszva. Így alakul ki a MT jellegzetes hengeres formája.



1. ábra: A MT szerkezete

A MT-ok sejten belüli térbeli elrendeződését a MTOC-ok irányítják. Állati sejtekben a domináns MTOC a sejtközpont (centroszóma). A MT-ok végei az itt található,  $\gamma$ -tubulinból álló gyűrűkhöz kapcsolódnak. Egy-egy ilyen gyűrű 13 alegységből áll és polimerizációs magként működik, melyre az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinból álló heterodimerek fokozatosan ráépülnek. A gyűrűt felépítő alegységek száma *in vivo* körülmények között szigorúan szabályozott (mindig 13), míg *in vitro* ez a szám eltérő lehet (8-11).

A tubulin heterodimerek MT-hoz történő asszociációjának ill. disszociációjának sebességét adott körülmények között az oldat szabad dimer koncentrációja szabja meg. Ha a szabad dimer koncentráció meghaladja a polimerizációhoz szükséges kritikus koncentrációt, akkor polimerizáció, ellenkező esetben depolimerizáció fog bekövetkezni. Ez a kritikus koncentráció

a cső két végén nem azonos, így megkülönböztethetünk egy gyors (“+”) és egy lassú (“-”) véget. Létezik egy olyan dimerkoncentráció-tartomány, melyen belül a lassú végén depolimerizáció történik, ugyanakkor a gyors végén asszociáció. Ezt az állapotot "taposó malom"-nak („treadmilling”) nevezték el (12). A kialakuló, igen finoman hangolt egyensúlyt nagymértékben képesek befolyásolni a különböző, MT-al kölcsönható fehérjék.

A  $\beta$ -tubulin GTP-áz aktivitása azt eredményezi, hogy a beépüléskor GTP tartalmú dimerek GTP tartalma megadott idő múlva elhidrolizál. Ha a dimerek beépülése lassabb, mint a hidrolízis, és egy csővégen GDP tartalmú dimerek jelennek meg, az annak a MT szálnak az azonnali depolimerizációjához vezet. Ez a jelenség okozza a mikrotubulus szálak dinamikus instabilitását. A sejtben a tubulin és így a MT-ok össz mennyisége időben jelentősen nem változik, de az egyes MT-ok végei hol növekedési, hol rövidülési fázisban vannak. A sejt tehát energiát (GTP-t) használ fel arra, hogy a rendszert állandóan átalakulásra kész állapotban tartsa. Különösen gyors a mikrotubuláris apparátus átrendeződése az osztódás során, a mitotikus orsó kialakulása és működése közben (13).

Mivel a tubulin C-terminális régiója sok glutaminsavat tartalmaz, így fiziológias pH-n negatív töltésű. Ezen kívül ez a régió a MT összeállása során a kialakuló cső felszínére kerül (14), és gyakran erre a negatív töltésű felszínre további fehérjék asszociálódnak.

### ***A mikrotubulus polimerizációját, dinamikáját és funkcióját befolyásoló anyagok***

A MT-ok igen sokrétű feladatának ellátását és összehangolását a hozzájuk kapcsolódó fehérjék, azon belül is elsősorban az ún. MAP-ek (mikrotubulushoz asszociált proteinek) teszik lehetővé. A MT-hoz kötődő fehérjéket tulajdonságaik alapján 3 csoportra oszthatjuk:

A strukturális MAP-ek a MT térbeli elrendeződésében és stabilitásának szabályozásában vesznek részt. Ezek a hosszú, fonalszerű fehérjék különösen nagy mennyiségben fordulnak elő idegszövetekben. Ilyenek például a MAP1, MAP2 és a tau (15).

A motor MAP-ek mindegyike több alegységből álló fehérje. Globuláris, feji végeikkel kötődnek a MT-okhoz, és ATP elbontása mellett azon végig tudnak lépkedni, míg farki részük más fehérjékhez, membránokhoz, vezikulákhoz kötődhetnek. A sejten belüli irányított anyagmozgatás (pl. vezikuláris transzport, kromoszómák szállítása a mitózisban) ezen MT-okhoz kapcsolt motorfehérjék segítségével valósul meg. Ilyen motorfehérjék például a kinezinek, valamint a dineinek (16).

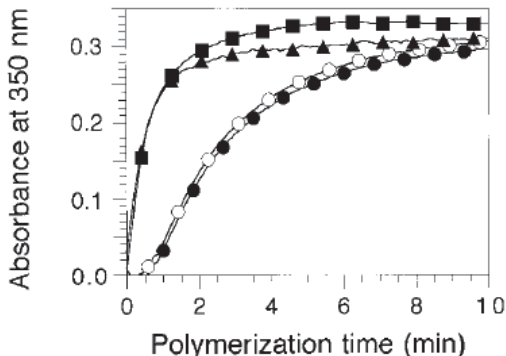
A MAP-ek harmadik csoportját az olyan fehérjék alkotják, melyek lazán, átmenetileg kötődnek a MT-okhoz. Ezek a fehérjék tipikusan ún. citoszolikus fehérjék. A MT-sal dinamikus kölcsönhatásban vannak, aminek következtében megváltozhat a kölcsönható fehérje katalitikus-, ill. regulációs tulajdonsága. Ilyenek például bizonyos, a glikolízisben ill. a transzlációban résztvevő enzimek (17, 18).

Különböző kémiai anyagok, kis molekulák is képesek a tubulin polimerizációját befolyásolni. Az antimikrotubuláris ágensek közül a legrégebben ismert a kolhicin (19), mely a tubulin heterodimerekhez szorosan kapcsolódva megakadályozza azok polimerizációját, illetve elősegíti a depolimerizációt. A másik, elterjedt, a MT polimerizációját elősegítő anyag a taxol, amely egy, a tiszta kérgéből kivonható alkaloid. Az előzőekkel ellentétben a polimerizációhoz szükséges kritikus koncentrációt csökkenti, így a tubulin polimerizációját elősegíti, és a keletkező MT-okat stabilizálja. Ezáltal más mechanizmussal, de ugyanúgy a dinamikus instabilitást, végső soron pedig a sejtosztódást gátolja, (20) ezért alkalmazható számos daganatos megbetegedés esetén. A taxol-kötődési kísérletek bizonyítják, hogy a taxol közvetlenül kötődik a MT-okhoz *in vivo* és *in vitro* körülmények között is. Taxol jelenlétében a tubulin heterodimerek az intakt MT-hoz hasonló szerkezetű tubulusokká asszociálódnak. Ezáltal lehetővé teszi MT-ok képződését alacsony hőmérsékleten, akár GTP és MAP-ek távollétében is (21).

## A TPPP/p25

A p25 nevű fehérjét egy tau protein kináz, a ciklin-dependens kináz-5 (cdk5) tisztítása közben fedezték fel, mint egy új, agyspecifikus fehérjét, amely szubsztrátja a cdk5-nek. Izelektromos fókuszálás során a fehérje izoelektromos pontja 9,9-nek adódott, ami igen bázikus karakterre utal (22). Megállapították továbbá, hogy a tau fehérjéhez hasonlóan hőstabil. SDS gélen 25 kDa-nak adódott a molekulatömege, géliszűrés alapján viszont 50 kDa-nak, ami arra utal, hogy a fehérje dimerként fordul elő (22). Egy későbbi tanulmányban ugyanez a kutatócsoport kimutatta, hogy a p25 mennyisége születéskor viszonylag kevés, és az életkor előrehaladtával folyamatosan nő. A TPPP/p25 elsősorban a glia sejtekben fordul elő. (23). A fehérje DNS szekvenciáját marha cDNS könyvtár segítségével (24) és humán neuroblasztóma sejtekből származó cDNS klón (25) alapján is meghatározták. A két gén által kódolt fehérje 90%-os azonosságot mutat aminosav szinten. Seki és munkatársai kimutatták, hogy a p25-öt kódoló gén az 5. kromoszóma telomer régiójában helyezkedik el: az 5p15.3 helyen (25).

Az Enzimológiai Intézetben, dr. Ovádi Judit kutatócsoportjának ettől független megfigyelése volt, hogy a tubulin polimerizációját az agyi és neuroblasztóma extraktumok koncentrációfüggő módon befolyásolják (26).

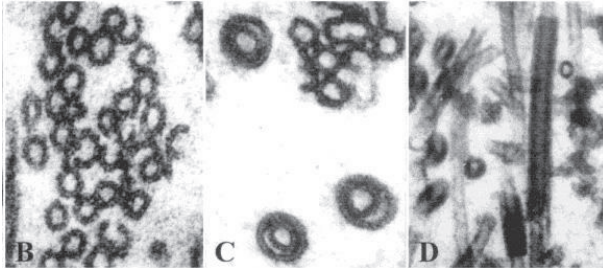


2. ábra: (Lásd: (26)) Különböző sejtmentes extraktumok hatása a tubulin polimerizációjára. 10  $\mu$ M MAP-mentes tubulin polimerizációja, taxollal indukálva, 350 nm-en követve önmagában (○), valamint 2 mg/ml agyextraktum (■) 0,25 mg/ml neuroblasztóma-extraktum (▲) vagy 2 mg/ml izomextraktum (●) jelenlétében

A taxol jelenlétében történő tubulin polimerizációját vizsgálva Liliom és munkatársai megállapították, hogy a 10  $\mu$ M koncentrációjú, mikrotubuláris fehérjétől mentes tubulin polimerizációját a 2 mg/ml-es agyextraktum, vagy 0,25 mg/ml-es neuroblasztóma-extraktum hozzáadása felgyorsította. Érdekes módon ez a hatás nem volt megfigyelhető izomextraktum hozzáadásakor, ami a hatás specifikus voltára utalt (2. ábra).

Hosszas munka eredményeként kutatócsoportunkban sikerült izolálni a hatásért ténylegesen felelős fehérjét, mely tubulin polimerizációt előidéző hatása és a móltömege miatt a TPPP/p25 nevet (Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25) kapta, megkülönböztetve ez által a fehérjét a hasonlóan p25-nek nevezett fehérjétől, mely a p35 hasítási terméke, és a cdk5 szabályozásában van fontos szerepe (1). Kutatócsoportunk is megerősítette, hogy a TPPP/p25 igen bázikus, és hőstabil. Kimutattuk továbbá, hogy nem rendelkezik jól definiált harmadlagos szerkezettel: CD spektroszkópiával a fehérje  $\alpha$ -hélix tartalma közelítőleg 4%-nak adódik, habár a globuláris fehérjékre alkalmazott másodlagos szerkezet jóslások szerint legalább 30% körüli  $\alpha$ -hélix tartalommal kellene rendelkeznie. Az izolált fehérje a tubulin polimerizációját már szubsztóchiometrikus koncentrációban elősegíti (1).

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a TPPP/p25 a tubulinból képes aberráns, zömében kettős falú MT-okat képezni. (3. ábra **C**, **D**) A taxollal stabilizált MT szálakat pedig kötegekbe rendezi (3. ábra **B**) (1).



3. ábra: (Lásd: (1)) **B**: taxollal stabilizált MT-hoz adott TPPP/p25 által indukált kötegelt MT-ok, **C** és **D**: tubulinhoz adott TPPP/p25 hatására kialakult aberráns MT-ok. A **C** és **D** ábra különböző irányú metszeteket mutat.

Amennyiben a TPPP/p25 *in vivo* hatásának megállapításához GFP-tubulint expresszáló *Drosophila* embrióba fecskendezték a fehérjét, a TPPP/p25 megakadályozta a mitotikus orsó kialakulását és a maghártya lebomlását az osztódás során, miközben egyéb, sejtosztódáskor lejátszódó folyamatokat nem befolyásolt, így például nem érintette a centroszóma megkettőződését és szétválását, a MT szálak hozzákötődését a centroszómákhoz, vagy a mag növekedését (2).

Érdekes módon a TPPP/p25-tubulin kölcsönhatást a GTP jelenléte *in vitro* (a polimerizációs) és *in vivo* (a *Drosophila* embrióban végzett kísérlet során) is gátolja (2).

Martin és munkatársai kimutatták, hogy a TPPP/p25 kötődik a tau foszforiláló glikogén szintáz kináz (GSK3) fehérjéhez, és annak aktivitását gátolja. A GSK3 másik neve tau protein kináz 1 (TPK1), ami felveti a TPPP/p25 szerepét a tau foszforiláltságának szabályozásában (27). Kimutatták továbbá, hogy a TPPP/p25 jó szubsztrátja a protein kináz A-nak (PKA), *in vitro*. Ezen kívül a TPPP/p25 szekvenciájában megtalálható a <sup>14</sup>TPPKSP<sup>19</sup> motívum, melyet a ciklin dependens kináz 5 (cdk5) ismer fel és foszforilál. Ez a szekvencia a tau fehérjében is megtalálható (22).

A TPPP/p25 szekvenciájában található egy ún. Rossmann-motívum is, amely a GxGxxG konszenzus szekvenciával jellemezhető, és amely jellegzetes nukleotid kötő hely (2).

### **A TPPP/p25 egy feltételezett új fehérjecsalád első izolált tagja**

Mind a szarvasmarha (24) mind pedig az ember (25) TPPP/p25-öt kódoló génjét azonosították klónozás segítségével, és kimutatták, hogy igen magas, 90%-os az azonosság a két géntermék között. Később az egérben található változatot is leírták, és itt is jelentős egyezés figyelhető meg mind az emberben, mind a marhában előforduló fehérjéhez képest (humán-egér: 93%-os, és marha-egér: 87%-os azonosság). Ráadásul, ha a konzervatív aminosavcseréket is megengedjük, a páronkénti hasonlóság már több mint 95%-os.

A TPPP/p25 fehérje nem mutat számottevő hasonlóságot egyetlen más, eddig izolált és jellemzett fehérjével sem, viszont génszinten szekvencia összehasonlításokat végezve a BLAST program segítségével (Gish, W. (1996–2003) BLAST, <http://blast.wustl.edu>, Version 2.0.) (28) további gének mutathatók ki, melyek rövidebb, de hasonló hipotetikus fehérjéket kódolnak. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a kutatócsoportunk által leírt TPPP/p25 egy új fehérjecsalád első, fehérje szinten izolált tagja (2).

### **Rendezetlen fehérjék**

A sejtekben a fehérjék nagyobb része jól definiált másodlagos- illetve harmadlagos szerkezettel rendelkezik. A biokémia egyik legfontosabb alapvetése, a fehérje szerkezet-funkció paradigma feltételezi, hogy a fehérjék feladatukat a rájuk jellemző meghatározott fehérjeszerkezetek, szerkezeti motívumok segítségével töltik be. Az utóbbi időben azonban egyre több fehérjéről, ill. fehérje szakaszcsoportokról mutatják ki, hogy jól definiált térszerkezet nélkül fejt ki hatását, vagy vesz részt patológias folyamatokban, ami a szerkezet-funkció összefüggésekkel kapcsolatos alapvető nézeteink újragondolására késztetett (29, 30).

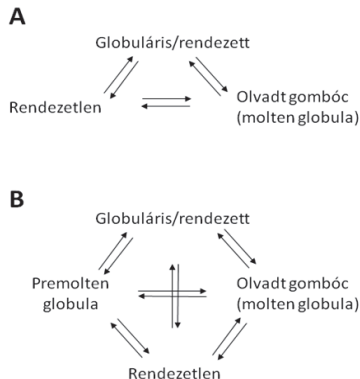
A különféle genomok (köztük a humán genom) megfejtésével egyre több fehérjeszinten is ismert, vagy génszekvencia alapján jósolt fehérjéről derül ki, hogy fiziológias körülmények között is hosszabb-rövidebb rendezetlen szakaszt tartalmaznak, esetleg teljes egészében jellemző rájuk a jól definiált 3D szerkezet hiánya, azaz a rendezetlen fehérjék családjába sorolhatók. Dunker és munkatársai megállapították, hogy az eukarióta fehérjék több mint 30%-a tartalmaz hosszú (50 aminosavnál hosszabb) rendezetlen régiót, míg 6-17%-uk teljes hosszában rendezetlen (31). Amennyiben a rövidebb, 30-50 aminosavból álló rendezetlen régiókat tartalmazó fehérjéket is az IUP-k közé soroljuk, a rendezetlenség részaránya még szembetűnőbb (32).

A rendezetlen fehérjék is tartalmaznak szinte minden esetben a polipeptid láncban kialakuló átmeneti vagy tartós másodlagos szerkezeti elemeket, és az is lehetséges, hogy ennél is

kompaktabban, másodlagos szerkezetek laza halmazából épülnek fel. A legáltalánosabban használt definíció szerint a rendezetlen fehérjék elnevezést azokra a fehérjékre használjuk, melyeknek tisztított állapotukban, semleges pH-n (akár kísérletekkel bizonyítottan, akár előrejelzés alapján) nincs specifikus szerkezetük, és számos különféle, dinamikusan változó konformáció együttesével írhatóak le. (33)

A rendezetlen fehérjét három csoportra lehet osztani. Az első csoport fehérjei leginkább az ún. olvadt gombóc, „molten globule” állapothoz hasonlíthatók, azaz flexibilisek, nincs a merev, harmad- vagy negyedleges szerkezetük, de viszonylagosan kompaktak. A kisszőgű röntgenszórással (SAXS) és 2D NMR-el végzett kísérletek is egészen natív-szerűnek mutatják őket. Jellemzően ezek a fehérjék fokozott érzékenységet mutatnak a proteázokkal szemben, és nagy az affinitásuk a hidrofób fluoreszcens próbákhoz, mint amilyen az 1-anilinonaftalin-8-szulfonsav (ANSA) is. A másik csoportba tartozó fehérjék szinte teljesen „random-coil” szerűen viselkednek (32). E két típus között találhatók az ún. „premolten globule” állapottal leírható fehérjék. Ezek a fehérjék kevésbé kompaktak, mint az jellemző az „olvadt gombóc” vagy még inkább a natív fehérjékre, viszont több másodlagos szerkezeti elemet tartalmaznak, mint a „random-coil” típusú fehérjék (34) (ld.4. ábra).

Dunker és munkatársai fogalmazták meg az ún. „fehérje szentháromság” modellt, melyben kiterjesztik a hagyományos szerkezet-funkció paradigmát az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjékre is. Állításuk szerint a funkció a rendezett, az olvadt gombóc és a rendezetlen állapotból, ill. az azok közötti átmenetből egyaránt eredhet, és bármely állapot lehet egy fehérje natív állapota. Ezt a modellt Uversky és munkatársai még tovább bővítették a premolten globula állapot megkülönböztetésével az ún. „fehérje kvartett” modellé (29).



4. ábra: „Fehérje szentháromság” (A) és „fehérje kvartett” modell (B)

A rendezetlen fehérjék szerkezeti rugalmasságuk miatt igen sokoldalúak: általában sokféle fehérjéhez képesek kötődni, és sok esetben képesek megváltoztatni a szerkezetüket és/vagy funkciójukat a környezet változásait követve. Gyakran a szerkezetük is megváltozik, rendezettebbé válik a kölcsönható partnerekhez (célfehérjékhez, szaponokhoz, lipid membránokhoz vagy egyes kémiai anyagokhoz) való kötődés során, ezt indukált feltekeredésnek nevezik.

A globuláris fehérjékhez képest a rendezetlen fehérjék szekvenciális jellemzői is egészen mások. A legtöbb esetben alacsony hidrofobicitás, ugyanakkor nagy össztöltés jellemző rájuk (29, 32, 35). Másképpen megfogalmazva az átlagosnál kevesebb „rendezettséget elősegítő” (hidrofób) aminosavat tartalmaznak, az ún. „rendezetlenséget elősegítő” (poláris aminosavakat és a prolint) pedig az átlagosnál nagyobb arányban tartalmazzák (35).

A rendezetlen fehérjék részaránya az összes fehérjéhez viszonyítva a prokariótáktól a fejlettebb, többséjtű állatok irányába a komplexitással együtt növekszik (29).

Nem meglepő, hogy flexibilitásuk és sokoldalúságuk miatt a rendezetlen fehérjék elengedhetetlenek például a jelátvitelben, a mozgásban és az emlékezésben.

### Rendezetlen fehérjék szerepe a neurodegenerációs betegségekben

A társadalom előregedésével a neurodegenerációs betegségek egyre inkább népbetegséggé válnak. Ezen betegségek keletkezési mechanizmusának megismerése napjainkban is intenzív kutatás tárgyát képezi. A molekuláris biológiai, szöveti és ultrastrukturális vizsgálatok



segítségével, valamint transzgenikus egér modellek alkalmazásával bizonyítást nyert, hogy a neurodegeneráció kialakulása többlépcsős folyamat. Egyes neurodegeneratív kórképek kialakulása során bizonyos, általában rendezetlen fehérje szerkezete (pl.  $\alpha$ -szinuklein, tau és a mutáns huntingtin fehérje) különféle biokémiai folyamatok következményeként megváltozik. Ez fokozott aggregációs aktivitáshoz és aberráns kölcsönhatások kialakulásához vezet, ami végső soron zárványtestek képződését, majd különféle neuron csoportok pusztulását eredményezi. Az ilyen, ún. konformációs neurodegeneratív betegségek, mint az Alzheimer kór (AD), és Parkinson kór (PD) közös jellemzője, hogy a betegségek kiinduló pontjai minden esetben ún. „unfolded/misfolded” fehérjék, azaz nem-, vagy rosszul feltekeredett fehérjék, melyek aberráns kölcsönhatásokba lépve patológias fehérje aggregátumokat hoznak létre az agy különböző területein, melyek végső soron az idegsejtek pusztulásához vezetnek. Sok esetben a normálistól eltérő poszt-transzlációs módosulások, például túlzott mértékű foszforiláció figyelhető meg a neurodegenerációban részt vevő fehérjeformáknál. Ily módon a rendezetlen fehérjék rendszerint aktív résztvevői a PD, az AD, illetve a Huntington kór patomechanizmusának.

Kutatócsoportunkban kimutatták, hogy a TPPP/p25 is érintett bizonyos neurodegeneratív betegségek kialakulásában. Immunohisztokémia és konfokális mikroszkópia segítségével megmutatták, hogy a TPPP/p25 feldúsul a szálal  $\alpha$ -szinukleint is tartalmazó ún. Lewy-testekben a PD és az ún. diffúz Lewy-testes betegség (DLBD) esetén, csakúgy, mint a multiszisztémás atrofia (MSA) glia-sejteket érintő zárványaiban. Ezzel ellentétben a TPPP/p25 nem mutatott kolokalizációt a hiperfoszforilált tau fehérjével az AD esetén, és a többi, ún. taupátiában (3). Lindersson és munkatársai közvetlen kölcsönhatást is kimutattak a TPPP/p25 és az  $\alpha$ -szinuklein között, valamint megmutatták, hogy a TPPP/p25 elősegíti/indukálja az  $\alpha$ -szinuklein oligomerizációját (36).

Ezért is kiemelt jelentőségű feladat ezen fehérjék kölcsönhatásának, ultrastruktúráinak, szerkezeteinek, illetve a sejten különböző célfehérjékkel kialakított komplexek vizsgálat, mert ez által juthatunk közelebb a patológias folyamatokban betöltött szerepük megértéséhez.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek során felhasznált fehérjéket és vegyszereket a Sigma-Aldrich magyarországi kirendeltségétől rendeltem, az ettől eltérő forrásokat a szövegben vagy ebben a fejezetben ismertetem.

### Fehérjepreparálás

#### *Tubulin és mikrotubulus preparálása marhaagyból*

A MAP-mentes tubulint marhaagyból izoláltam, Na és Timasheff módszere alapján (37). Az így preparált tubulint -80°C-on, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufferben tároltam, (pH 7,0) amely 1M glükózt, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot és 0,1 mM GTP-t is tartalmazott.

A tubulint felhasználás előtt 50 mM MES és 1 mM DTE (Reanal) tartalmú pufferben (pH 6.4) dializáltam 4°C-on, 3 órán át, majd ultracentrifugáltam 100000g-n, 4 °C-on, 25 percig. A felülszóban levő tubulint polimerizáló pufferben (50 mM MES, 50 mM KCl, 2 mM DTE, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,6) 20 µM taxol hozzáadásával polimerizáltam, 37°C-on, 30 percig. A keletkezett MT-okat 15000g-vel centrifugáltam, 30 percig, 37°C-on. A csapadékban levő MT-okat polimerizáló pufferrel a kívánt koncentrációra hígítottam.

#### *TPPP/p25, TPPP/p20 és TPPP/p18 preparálása*

A humán TPPP/p25 cDNS-ét humán magzati agy RNS-éből (BD Clontech) sokszorozták fel, RT-PCR technikával. A kapott fragmentumot pCR2.1-TOPO plazmidba helyezték, majd az így kapott plazmidot pT7-P1 vektor BamHI és EcoRI helyei közé illesztették be. A humán TPPP/p20 és TPPP/p18 cDNS-ét az MRC Geneservice cég bocsátotta rendelkezésünkre. A nyitott leolvasási kereteket felsokszorozták, majd pTrcHisB (Stratagene) vektorba illesztették be NheI és EcoRI restrikciós helyek segítségével. A TPPP/p25 (Δ3-43) mutáns esetében a fehérje N-terminálisáról hiányzik a 3-43 aminosavig terjedő rész. Ehhez a fehérjéhez a pET15b-TPPP/p25 vektort használták templátként. A PCR terméket szintén pET15b vektorba helyezték, az XhoI és BamHI restrikciós helyek közé. A kapott vektorokat szekvenálással ellenőrizték. A minden esetben His<sub>6</sub> tag-et hordozó fehérjéket ezután E. coli BL21 sejtekben expresszáltam, majd His Select<sup>TM</sup> Cartridge gyantán tisztítottam, a gyártó előírásai szerint (3, 38).

### ***Kalmodulin preparálása marhaagyból***

A CaM-t marhaagyból izoláltam fenil-szefaróz gyantán történő kromatográfiás elválasztás segítségével, Gopalakrishna és Anderson módszere szerint (39).

### ***$\alpha$ -szinukleín preparálása***

Az NACP plazmidot, amely a humán  $\alpha$ -szinukleint kódolja, pT7-7 vektor Nde I és Hind III helyei közé illesztették be. A fehérjét ezek után E. coli BL21 DE3 sejtekben expresszáltam, 100  $\mu$ g/ml ampicillin jelenlétében. A sejteket tartalmazó csapadékot felfuszpendáltam 20 mM Tris-HCl pH 7,5-es pufferben, amely tartalmazott 1 mM EDTA-t, 50 mM NaCl-ot, 5 mM 2-merkaptotetanolt, 10  $\mu$ M 4-(2-aminoetil) benzénszulfonil-fluorid-hidrokloridot, 1 mM benzamidint, 1  $\mu$ g/ml pepstatint és 1  $\mu$ g/ml leupeptint. 6x 30 mp szonikálást és 25 perc centrifugálást (32000g, 4 °C) követően a felülúszót 90 °C-on tartottam 10 percig. A kicsapódott fehérjéket ismételt centrifugálással eltávolítottam (25 perc, 40000g, 4 °C). A felülúszót 1 mM EDTA-t és 50 mM NaCl-ot tartalmazó 20 mM, pH 7.5-es Tris-HCl pufferrel ekvilibrált DE52 gyantára vittem fel. A nem kötődött fehérjéket mosással eltávolítottam, majd az  $\alpha$ -szinukleint 1 mM EDTA-t és 150 mM NaCl-ot tartalmazó 20 mM, pH 7.5-es Tris-HCl pufferrel eluáltam. Az YM 3 Diaflo membránon (Amicon) történő töményítés után a fehérjét liofilizáltam.

### ***Fehérjekoncentráció meghatározása***

A fehérjetartalom rutinszerű meghatározását spektrofotometriás módszerrel végeztem: a fehérjeoldatok fényelnyelését mértem 280 nm-en. A spektrumban 280 nm-nél észlelhető abszorpciós csúcs elsősorban a fehérjében lévő triptofán és tirozin oldalláncoktól származik. Így a fehérje aminosav sorrendje alapján kiszámítható az úgynevezett elméleti fajlagos extinkciós koefficiens ( $\epsilon^{0,1\%}$  (1 cm, 280 nm)), amely lényegileg az 1 mg/ml-es fehérjeoldat elnyelését adja meg. Ennek alapján a fehérjeoldat ultraibolya spektrumában 280 nm-en észlelt, a puffer elnyelésével korrigált abszorbancia értékből a fehérjekoncentráció közvetlenül számítható. Egyes esetekben a fehérjekoncentráció meghatározást a Bradford módszer szerint is elvégeztem (40).

fehérje	$\varepsilon^{0,1\%}$
tubulin	1,06
TPPP/p25	0,42
TPPP/p25 $\Delta$ 3-43	0,52
TPPP/p20	0,64
TPPP/p18	0,41
szubtilizin	0,75
kimotripszin	1,07
kalmodulin	0,18
$\alpha$ -szinuklein	0,41
tripszin	1,44

1. táblázat: A különböző fehérjék elméleti fajlagos extinkciós koefficiense

### ***Citoszolikus agyextraktum készítése***

A citoszolikus sejtextraktumot marhaagyból készítettem. Az agyszövetet kézi homogenizátorban homogenizáltam 50 mM PEM pufferben. (50 mM PIPES, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, és 1  $\mu$ g/ml pepsztatin, pH 6,6) Az alkalmazott szövet-puffer arány 1:1,5 volt. A homogenizátumot 30000g-vel 4°C-on 20 percig centrifugáltam. A felülúszót ismét centrifugáltam, ezúttal 100000g-vel, szintén 4°C-on, 30 percig. Az így kapott, kb. 25 mg/ml összkoncentrációjú fehérjeoldatot használtam, mint citoszolikus marhaagy-extraktumot. Néhány esetben ebből az extraktumból még eltávolítottam a mikrotubuláris fehérjéket a következő módon: az extraktumhoz 1 mM GTP-t és 20  $\mu$ M taxolt adtam, az elegyet 30 percig inkubáltam 37°C-on, majd a keletkezett csapadékot, mely a mikrotubuláris fehérjéket tartalmazta, 10000g-vel, 37°C-on, 30 percig centrifugáltam.

### ***Limitált proteolízis***

A TPPP fehérjék proteolitikus érzékenységének meghatározásához 2 mg/ml TPPP/p25, TPPP/p20 vagy TPPP/p18 fehérjét emésztettem 0,01 mg/ml tripszin IV-el (enzim-szubsztrát arány: 1:200) 50 mM Tris pufferben, amely 10 mM CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazott, pH 8,0-on, 25°C-on. A megfelelő kontroll kísérletet is elvégeztem, azonos körülmények között, de tripszin IV nélkül. Az emésztést hasonlóképpen elvégeztem kimotripszinnel is. Ebben az esetben 1 mg/ml fehérjét emésztettem 0,005 mg/ml kimotripszinnel (enzim-szubsztrát arány hasonlóan 1:200)

50 mM MES pufferben, amely 5 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 1 mM EGTA-t tartalmazott, pH 7,0-en, szintén 25°C-on. Különböző időpontokban mintát vettem az elegyekből, és a kivett mintában az emésztést leállítottam proteáz inhibitor, fenil-metil-szulfonilfluorid (PMSF) hozzáadásával. Az inhibitor végkoncentrációja 1 mM volt. Az így kapott mintákat Tris-tricin SDS-PAGE gélben teszteltem (41).

A TPPP/p25 tubulint kötő régiójának meghatározásához 1 mg/ml-es TPPP/p25-öt emésztettem 0,005 mg/ml végkoncentrációjú kimotripsinnel illetve ugyanennyi szubtilizinnel, 50 mM pH 7,0-es MES pufferben, amely tartalmazott 5 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 1 mM EDTA-t. Az emésztést 1 mM PMSF hozzáadásával állítottam le

A tubulin TPPP/p25 kötő régiójának meghatározásához 2 mg/ml-es tubulint emésztettem 0,01 mg/ml szubtilizinnel, 50 mM pH 6,6-os MES pufferben, ami tartalmazott 50 mM KCl-ot, 1 mM EDTA-t, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 2 mM EDTA-t. Az emésztést 2 mM PMSF hozzáadásával állítottam le.

Az  $\alpha$ -szinuklein TPPP/p25-öt kötő régiójának meghatározásához 2 mg/ml-es  $\alpha$ -szinukleint emésztettem 0,005 mg/ml-es tripszinnel, 10 mM pH 7,2-es foszfát pufferben. Az emésztést tripszin inhibitor hozzáadásával állítottam le, amelynek a végkoncentrációja 15 mg/ml volt.

### ***Affinitáskromatográfia***

A TPPP/p25-öt brómcíannal aktivált Sepharose 4B gyantához kötöttem, a gyártó cég (Amersham) utasításai szerint. A gyantához kötött TPPP/p25-öt oszlopba töltöttem. Az oszlop kötési kapacitása kb. 3 mg/ml fehérje volt 1 ml Sepharose gyantára számolva. Az így kapott affinitásoszlopot 10 mM pH 7,0-es  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pufferrel hoztam egyensúlyba, mely 10 mM NaCl-ot is tartalmazott (mosó puffer). Az elkészített citoszolikus sejtextraktumokat (a mikrotubuláris fehérjékkel együtt, vagy azok nélkül) felvittem az oszlopra, majd a nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében az oszlopot mosó pufferrel mostam. A kötött fehérjéket ezután 150 mM vagy 500 mM NaCl-ot tartalmazó mosó pufferrel eluáltam. Minden esetben kb. 2 ml, kb. 25 mg/ml koncentrációjú agyextraktumot vittem fel az oszlopra, mely kb. 1 ml gyantát tartalmazott. Az eluált fehérjék összmenyisége általában kísérletenként kb. 500-800  $\mu\text{g}$  volt. Minden egyes kísérlet után az oszlopot regeneráltam. Ehhez háromszor egymás után váltakozva 0,1 M-os, 0,5 M NaCl-ot tartalmazó pH 4,0-es Na-acetát pufferrel, majd 0,1 M-os, 0,5 M NaCl-ot tartalmazó pH 8,0-as Tris pufferrel mostam az oszlopot. Az oszlopról eluált fehérjéket Amicon töményítőcellában töményítettem, YM-10 membrán használatával. Az így kapott kötött frakciót SDS-PAGE gélre vittem fel.

### **Western-blot analízis**

Az SDS-PAGE gélből a Western-blot analízishez a fehérjéket Immobilon P<sup>SO</sup> membránra transzferáltam át. A membránokat blokkolás után a megfelelő elsődleges ellenanyaggal immunizáltam. A használt ellenanyagok a következők voltak:

fehérje	gazdaállat	hígítás
GAPDH (nyúlizomból)	patkány	1:1000
$\alpha$ -tubulin	egér	1:2500
$\alpha$ -szinuklein	egér	1:5000
TPPP/p25	patkány	1:5000

2. táblázat: A felhasznált ellenanyagok és hígításuk.

Az antigén-antitest kölcsönhatás kialakulását anti-patkány, vagy anti-egér (minden esetben 1:10000 hígításban) peroxidázzal jelzett IgG-vel való inkubálás után ECL (enhanced chemiluminescence) Western-blot előhívó reagenssel (Amersham) Kodak X-Omat AR filmen (Sigma) tettem láthatóvá.

### **Cirkuláris Dikroizmus (CD) mérések**

A CD spektrumokat Jasco J-720 (Tokio, Japán) spektropolariméterrel vettem fel a 190-280 nm-es hullámhossz-tartományban. 0,1 cm úthosszúságú, termosztálható kvarcküvetét használtam. A méréseket 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufferben végeztem, pH 7,0-en. A spektrumokat egymás után háromszor vettem fel, majd a három mérés átlagát használtam fel. A puffer spektrumát minden esetben korrekcióként levontam a minták spektrumából. Az egyes minták  $\alpha$ -hélix tartalmát a 222 nm-en mért ellipticitásból ( $\Theta_{222}$ ) a következő egyenlet alapján számítottam ki (8):

$$\% \alpha\text{-hélix} = (|\Theta_{222}/(10ncl)| - 2340)/303$$

ahol a  $\Theta_{222}$  a 222 nm-en mért ellipticitás millideg-ben,  $n$  a mért fehérjében található aminosavak száma,  $c$  a koncentráció mol/dm<sup>3</sup>-ben, és  $l$  a küvetta úthossza cm-ben. A TPPP fehérjék hőmérsékletfüggésének vizsgálatakor a spektrumokat 20°C és 70°C között 10°C-onként vettem fel.

### ***Turbiditásmérés***

A tubulint (ha a szövegben nem jelzem másként) 10  $\mu$ M-os (1 mg/ml) koncentrációban állítottam össze MT-á, 37°C-on, polimerizáló pufferben. A polimerizációt 3-7  $\mu$ M rekombináns humán TPPP/p25-el indítottam, a szövegben jelzett módon. A CaM jelenlétében végzett a mérések esetében módosított polimerizáló puffert használtam (50 mM MES 2 mM DTE, 1 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M EGTA, 100  $\mu$ M  $CaCl_2$  és 50 mM KCl, pH 6,6). A polimerizálódást turbiditásméréssel követtem, 350 nm-en, Cary 100 (Varian) spektrofotométerrel.

### ***Szedimentáció***

A szedimentációs kísérleteket polimerizáló pufferben végeztem (ld. tubulin és MT preparálása marhaagyból c. rész). Az egyes mintaösszeállításoknál a fehérjék (humán rekombináns TPPP/p25, TPPP/p20 vagy TPPP/p18, valamint a limitált proteolízis résznél leírt módon megemésztett fehérje fragmensek) koncentrációja 0,5 mg/ml volt, míg a tubuliné ill. MT-é 1 mg/ml. Egyes esetekben az adott TPPP fehérjét tubulinnal, míg más esetben MT-sal inkubáltam, 37°C-on, 15 percig. Ezután a mintákat centrifugáltam (15 perc, 15 000 g, 30°C), így elválasztottam a felülúszókat (F) és a csapadékokat (Cs). A csapadékokat egyszer mostam szobahőmérsékletű polimerizáló pufferrel, majd újra homogenizáltam ugyanannyi polimerizáló pufferben, mint amennyi a felülúszó térfogata volt. Az így kapott mintákat Tris-tricin SDS-PAGE gélen elválasztottam.

### ***Rendezetlen régiók jóslása***

A szekvenciát megvizsgáltam a PONDR szerveren található alapértelmezett VL-XT jóslóprogrammal (42, 43). A hozzáférési jogot a Molecular Kinetics (IUETC; Indianapolis, IN, USA; [main@molekularkinetics.com](mailto:main@molekularkinetics.com)) biztosította. Ezen kívül felhasználtam az Enzimológiai Intézetben fejlesztett IUPred jóslóprogramot (44), amely a <http://iupred.enzim.hu/> oldalon érhető el, és a RONN nevű, szintén rendezetlenséget jósló programot, amely a <http://www.strubi.ox.ac.uk/RONN> oldalon található (45).

Az ún. „stabilizációs központok” jóslása az Enzimológiai Intézetben kifejlesztett SCPRED programmal történt (<http://www.enzim.hu/scpred/>) (46).

### **SM betegek leírása**

44 SM beteg gerincvelői folyadékából vett mintát vizsgáltam. Ebből 30 beteg az SM ún. relapszáló-remittáló (RR) formájában szenvedett (6 férfi, és 24 nő; koruk:  $37,9 \pm 10,4$  év (átlag  $\pm$  SD); a betegség időtartama: 8,0 (3,0 – 67,5) hónap (medián és interkvartilis terjedelem); Kurtze féle kibővített rokkantsági állapot skála szerint az állapotuk (EDSS): 1,5 (1,0 – 2,0)). A maradék 14 beteg az SM ún. klinikailag izolált szindróma (CIS) fázisában volt, a betegség korai fázisában (3 férfi, és 11 nő; koruk:  $35,9 \pm 12,7$  év; a betegség időtartama 2,5 (1-10,8) hónap; állapotuk (EDSS): 0,0 (0,0-0,0)). Kontrollként 32 mintát vizsgáltam. Ezen pácienseknél diagnosztikai céllal vettek liquormintát, de esetükben semmilyen autoimmun neurológiai betegség nem igazolódott (10 férfi, 22 nő; koruk:  $36,9 \pm 12,3$  év). 14 beteg egyéb, nem gyulladásos neurológiai betegségben szenvedett (ENB, pl. epilepszia, cavernoma, agyidegbénulás vagy polineuropátia), 12 páciensnek egyéb, nem neurológiai betegsége volt (EB, pl. arcüreggyulladás, hiperprolaktinémia, porckorongsér, magas vérnyomás, szorongás vagy cukorbetegség) és 6 beteg pedig egyéb, gyulladásos neurológiai betegségben szenvedett. (EGYNB, pl. vírusos agyhártyagyulladás) A betegek esetében a diagnózist a nemzetközi gyakorlatban jelenleg érvényben levő ún. McDonald kritériumrendszer alapján állították fel (47, 48). Minden esetben történt MRI vizsgálat is a diagnózis megerősítésére. A gerincvelői folyadék levételének idejében egyik páciens sem kapott sem szteroidos, sem más kezelést. A tanulmány elvégzését a Szegedi Egyetem humán kutatásokat felügyelő etikai bizottsága jóváhagyta, és minden résztvevő páciensről rendelkezésre áll az informált döntést követő beleegyező nyilatkozat a vizsgálatban való részvétellel kapcsolatban.

A statisztikai analíziseket az SPSS Statistics 17.0 programmal készítettük. A statisztikai elemzés előtt ellenőriztük az adatpopulációk eloszlását a Shapiro-Wilk W teszttel, valamint elvégeztük a Levene tesztet a varianciák homogenitásának vizsgálatára. A betegek életkora normál eloszlást mutatott, így ebben az esetben független t-tesztet és egyszempontos varianciaanalízist végeztünk. Az összes többi változó nem-Gauss eloszlást mutatott, így ezekben az esetekben nem-paraméteres statisztikát használtunk: az ún. Mann-Whitney U tesztet 2 csoport összehasonlításakor, és az ún. Kruskal-Wallis tesztet több csoport összehasonlításakor. A nullhipotézist akkor vetettük el, ha a kapott p érték kisebb volt, mint 0,05 osztva az összehasonlítások számával. Az ilyen esetekben a különbséget szignifikánsnak tekintettük. A szenzitivitást a (valós pozitív/[valós pozitív+fals negatív]) képlet alapján, míg a specificitást a (valós negatív/[valós negatív+fals pozitív]) képlet alapján számítottuk. A



határérték megállapításakor a specificitás és szenzitivitás értékek összegének maximumát vettük figyelembe.

### ***ELISA***

A 96 lyukú ELISA lemezt (Greiner Bio-one) 5 µg/ml-es TPPP/p25 oldattal inkubáltam (100 µl/lyuk), éjszakán át, 4 °C-on. A nem kötődött fehérjét 'PBS pufferrel (10 mM Pi, 140 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,3) lemostam, majd 1 mg/ml szarvasmarha szérum albumint (BSA) tartalmazó 'PBS oldattal (blokkoló puffer) inkubáltam 1 órán át a lemezt, szobahőmérsékleten. Ezután a lyukakba különböző koncentrációban α-szinukleint ill. emésztett α-szinuklein fragmenst tartalmazó blokkoló puffert tettem, és így inkubáltam a lemezt 1 órán át, szobahőmérsékleten. Ezután anti-α-szinukleint (1:5000) tartalmazó, majd megfelelő, peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyagot (1:5000) tartalmazó blokkoló pufferrel immunizáltam a lemezt. Mindkét inkubációs lépés előtt a lemezt 'PBS pufferrel mostam. Az előhíváshoz 3,7 mM o-fenilén-diamint és 0,03% hidrogén-peroxidot tartalmazó oldatot használtam. A reakciót 10 perc után 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hozzáadásával állítottam le. A lemezt 490 nm-en olvastam le, Wallace Victor 2 multiplate reader segítségével.

### ***Pepscan analízis***

A TPPP/p25 10 tagú, egymással 5 aminosavanként átfedő peptidjeit Dr. Magyar Anna laboratóriumában szintetizálták, Fmoc stratégia szerint. A peptidek C-terminálisát kovalensen polietilén rudacsokhoz ("tühegyekhez") kötötték, míg az N-terminálisukat acetilezték. A kísérleteket 96 lyukú ELISA lemezekon végeztem. A tühegyeket 1 éjszakára blokkoló pufferbe, azaz 20 mg/ml BSA-t tartalmazó 'PBS oldatba merítettem, és 4 °C-on tároltam. Ez után az ismert epitópi, peptid ellen termeltetett ellenanyaggal végzett epitópmeghatározáshoz a tühegyeket friss blokkoló pufferbe hígított (1:1000) anti-TPPP/p25 ellenanyaggal inkubáltam, 1 órán át, szobahőmérsékleten. 3x10 perc 'PBS pufferrel végzett mosás után 1:5000 hígításban peroxidázzal konjugált anti-patkány másodlagos ellenanyagot tartalmazó blokkoló pufferrel történő inkubálás következett (1 óra, szobahőmérséklet). Ismételt 3x10 perces 'PBS mosás után előhívtam a lemezt, az ELISA módszerrel ismertetett módon. A regeneráláshoz ezután a tühegyeket 20 percig 65°C-os PBS oldatban szonikáltam, mely tartalmazott 1% SDS-t és 0,1% 2-merkaptóetanolt is. A tühegyeket 3x10 percig 65°C-os vízzel mostam, végül 1 percre metanolba merítettem. Egy peptid reakcióját akkor tekintettem pozitívnak, ha a mért

abszorbancia magasabb volt a lemez átlagos abszorbanciájának kétszeresénél. Az  $\alpha$ -szinukleinnel végzett mérések annyiban különböztek a fent leírt folyamattól, hogy a blokkolás után  $1,5\ \mu\text{M}$   $\alpha$ -szinukleint tartalmazó blokkoló pufferrel is inkubáltam a tűhegyeket (1 óra, szobahőmérséklet), és  $3 \times 10$  perc 'PBS mosás után anti- $\alpha$ -szinuklein (1:5000) ellenanyaggal, ezt követően pedig peroxidázzal konjugált anti-nyúl (1:7000) ellenanyaggal immunizáltam a tűhegyeket.

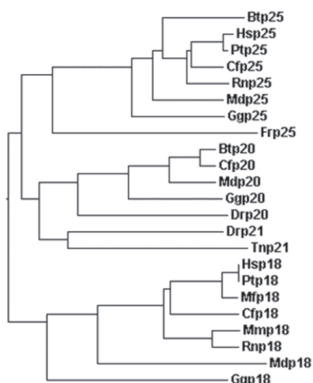
## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 1. A TPPP fehérjecs család szerkezeti és funkcionális jellemzése

#### Szekvencia összehasonlítás

Amint azt az irodalmi áttekintés részben felvetettem, a humán genom és az eddig leírt fehérjekészlet vizsgálata során kiderült, hogy a TPPP/p25 aminosav szekvenciája fehérje szinten jelentősen különbözik az eddig ismert fehérjék szekvenciáitól, és nem sorolható be az ismert fehérjecs családok egyikébe sem.

A BLAST program segítségével (Gish, W. (1996–2003) BLAST, <http://blast.wustl.edu>, Version 2.0.) (28) megvizsgáltuk, hogy gén szinten található-e a TPPP/p25-öt kódoló génnel rokon szekvencia a rendelkezésre álló, azonosított genomokban. Azt tapasztaltuk, hogy a TPPP-szerű, a TPPP/p25-tel magas homológiát mutató, bár még csak hipotetikus fehérjét kódoló gének megtalálhatóak mindenhol az állatok világában és a zöld algákban, de nincsenek jelen a prokariótákban, gombákban, szárazföldi növényekben. Itt érdemes megjegyezni, hogy az eddig leírt genomokat megvizsgálva igaznak látszik a felvetés, hogy a TPPP fehérjé(ke)t kódoló gén megtalálható a csillóval rendelkező élőlényekben, míg a csillóval nem rendelkezőkből hiányzik (49).



5. ábra: A TPPP család filogenetikai törzsfája gerincesek esetében. Bt, Bos taurus; Hs, Homo sapiens; Pt, Pan troglodydes; Mf, Macaca fascicularis; Cf, Canis familiaris; Mm, Mus musculus; Rn, Rattus norvegicus; Md, Monodelphis domestica; Gg, Gallus gallus; Fr, Fugu rubripes; Dr, Danio rerio; and Tn, Tetraodon nigroviridis. A Drp21 és Tnp21 olyan homológokat jelölnek, melyek 178 aminosavból állnak, és csak halakban fordulnak elő. (Néhány homológot (Mm p25, Tn p25, Hs p20, Mm p20, Rn p20, and Bt p18) az ábra áttekinthetősége érdekében nem tüntettem fel.)

Ezen génnek által kódolt proteinek mérete 192 és 225 aminosav között változik. Az azonosság ezen géntermékek között 40-48% közötti, és ekkora homológiát mutatnak a marha TPPP/p25-tel is. Ellenben, ha csak a C-terminális részt, az utolsó 50 aminosavat vizsgáljuk, az azonosság már 80% körüli (2).

A filogenetikai elemzés megmutatta azt is, hogy a TPPP fehérjéket emlősökben 3 elkülönülő csoportba lehet sorolni a méretük (aminosav számuk) alapján: TPPP/p25-ös, TPPP/p20-as és TPPP/p18-as csoportba. (ld. 5. ábra) Ez a hármassal alcsaládra tagolódás csak az emlősök (ember, csimpánz, marha, patkány, egér, kutya, oposzum) és egyéb gerinces fajok (csirke, hal) esetén jellemző, alacsonyabb rendű eukariótákban nem. A szekvenciák illesztése és a törzsfa felállítása a ClustalW program segítségével történt (50).

A humán genomban tehát a 219 aminosavas TPPP/p25-öt kódoló TPPP1 gén mellett két homológ szekvenciát sikerült azonosítani, melyek elnevezésünk és jellemzésünk alapján TPPP2 és TPPP3 néven kerültek be a HUGO Gene Nomenclature Committee adatbázisába ([http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc\\_search.pl](http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_search.pl)).

A TPPP3 más néven *CGI-38*, a TPPP/p20-nak nevezett, 176 aminosavas homológot kódolja, míg a TPPP2, más néven *p25beta*, a TPPP/p18-nak nevezett, 170 aminosavas fehérjét. A TPPP/p25, a TPPP/p20 és a TPPP/p18 génjei rendre az 5., a 16., és a 14. kromoszómán találhatóak. (25, 51)

A CGI-38 gént egy összehasonlító genomikai elemzés során mutatták ki, amikor olyan humán géneket kerestek, melyek konzerváltak a *C. elegans*-ban is (52). Később a *C. elegans*-ban levő TPPP/p20 ortológját megtalálták az egér transzkriptomban is (RIKEN cDNA 2700055K07) (53). Ezen kívül kutatócsoportunk kimutatta a fehérje jelenlétét marhaagynban, és izolálta is azt. Így a TPPP/p20, más néven TPPP3 a második, immár nem csupán hipotetikus, hanem fehérje szinten is kimutatott tagja a TPPP családnak (38). A harmadik homológot, a humán TPPP/p18-at mRNS szinten mutatták ki Zhang és munkatársai, ezt követően pedig klónozták is magzati agy cDNS-könyvtárból (51). A három fehérje közötti legszembevetőbb különbség, hogy a TPPP/p20 és a TPPP/p18 esetén a TPPP/p25 N-terminális régiója, az első 40-42 aminosav hiányzik.

Ennek az emberben – legalább gén szinten – előforduló három homológ fehérjének a szekvenciáját összehasonlítva (6. ábra) azt tapasztaljuk, hogy a három fehérje C-terminális része (a humán TPPP/p25 fehérje 55-219 aminosavas darabja, ami pfam15517 doménként ismert) magas hasonlóságot mutat egymással: a szekvenciák 53%-a azonos. A páronkénti *azonosság* és *hasonlóság* 63% és 81% (TPPP/p25 és TPPP/p20 között), 61% és 76%

(TPPP/p20 és TPPP/p18 között) és 57% és 75% (TPPP/p25 és a TPPP/p18 között). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a legnagyobb hasonlóság a TPPP/p25 C-terminális része és a TPPP/p20 között van. Az összes ismert gerinces állatban található homológot figyelembe véve a filogenetikai elemzés is azt mutatja, hogy a TPPP/p25-szerű és a TPPP/p20-szerű fehérjék közelebbi rokonságban állnak egymással, mint a TPPP/p18 szerű fehérjékkel. Érdeemes megjegyezni, hogy a paralógok közti hasonlóság összemérhető az ortológok között tapasztalhatóval, így például az emberben és a gömbhalban levő TPPP/p25 között 64%-os azonosság és 79%-os hasonlóság van.

[illegible]

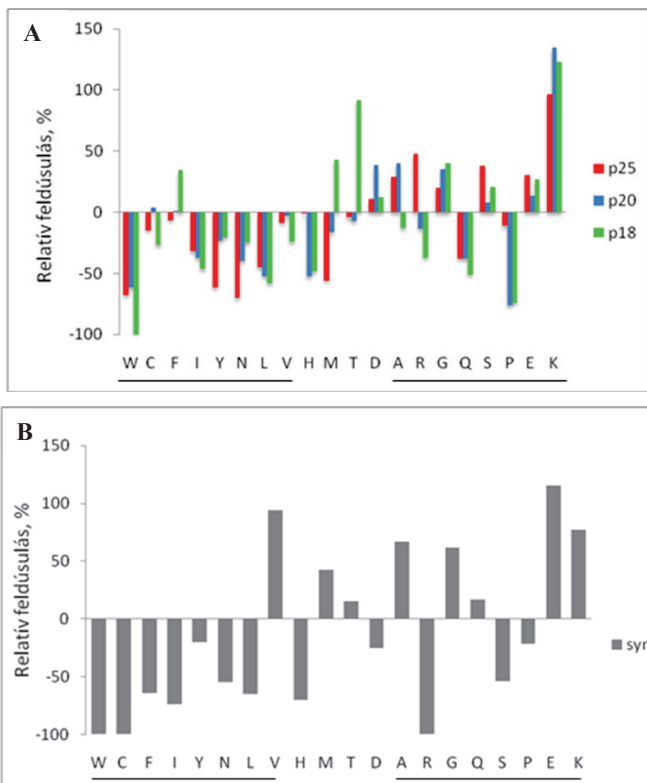
## A TPPP fehérjék szerkezeti tulajdonságainak összehasonlítása

### 1. A TPPP fehérjék szerkezetének jóslása különböző módszerekkel

#### *A másodlagos szerkezet jóslása az aminosav sorrend alapján*

Amint azt az irodalmi áttekintés fejezetben kifejtettem, a rendezetlen, vagy szerkezet nélküli fehérje kifejezés az olyan fehérjéket vagy fehérje-doméneket jelöli, melyek eredeti, funkcionális állapotukban, fiziológiás körülmények között sem rendelkeznek jól definiált térszerkezettel, ha nincs jelen valamilyen kötő partner (34). Az angol szakirodalom ezeket a fehérjéket Intrinsically Unstructured Protein-nek, azaz IUP-nek nevezi. Ezen fehérjéknek vannak olyan közös szekvencia-jellemzőik, melyek megkülönböztetik őket a globuláris fehérjéktől: a rendezetlen fehérjékben kevesebb ún. „rendezettséget elősegítő” aminosav van, viszont arányaiban több ún. „rendezetlenséget segítő” aminosav fordul elő (32). Számszerűsítve: össze kell hasonlítani egy adott aminosav átlagos előfordulási arányát a globuláris fehérjékben, (35) és a kérdéses rendezetlen fehérjében. (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) Azaz a kérdéses fehérje adott aminosavának előfordulási részarányából (mely egy 0 és 1 közötti érték) le kell vonni az adott aminosav rendezett fehérjékre jellemző előfordulási részarányát, majd a kapott különbséget elosztani a rendezett fehérjékre jellemző előfordulási részarányal. Így az aminosav relatív feldúsulását pozitív, míg a relatív hiányát negatív érték fogja jellemezni.

Elvégeztük ezt a számítást a TPPP fehérjék és „kontrollként” az  $\alpha$ -szinuklein eseténben is, amelyet tipikus rendezetlen fehérjeként tartanak számon. Mind a négy fehérje esetében jól megfigyelhető a rendezettséget elősegítő aminosavak (W, C, F, I, Y, L, V) hiánya, és a rendezetlenséget elősegítő aminosavak (A, R, G, Q, S, P, E, K) viszonylagos feldúsulása. (7. ábra)



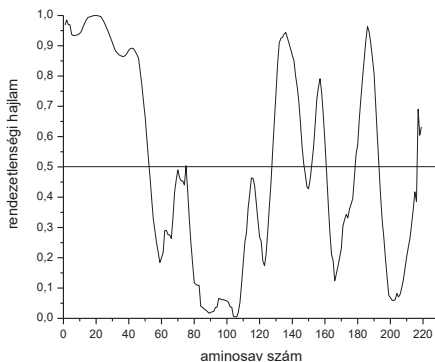
7. ábra: A: A TPSP fehérjék aminosav összetételének analízise, B: az  $\alpha$ -szinuklein aminosav összetételének analízise

### *A rendezetlen régiók jóslása*

A **PONDR®** (Predictors of Natural Disordered Regions) programot olyan fehérjék vagy fehérje régiók jóslására fejlesztették ki, melyek nem rendelkeznek jól definiálható harmadlagos szerkezettel, azaz flexibilisek, és részben vagy teljesen kitekeredett állapotban vannak (42, 43). A program az aminosav-szekvencia alapján a fehérje egy-egy adott régióján belül megjósolja a rendezetlen és rendezett szerkezet valószínűségét. Egy adott aminosav előtt és után 10-10 aminosavat vizsgál, azaz egy 21 aminosavból álló szekvenciát kiválasztva vizsgálja az aminosav-összetételt, illetve a hidrophil, hidrofób jelleget. A központi aminosavhoz egy adott értéket rendel, amely ha a küszöbérték (0,5) felett van, akkor a központi aminosavat rendezetlennek tekinti, ha ez



az érték 0,5 alatti, akkor a kérdéses aminosav rendezettnak tekinthető. Egy fehérje(régió) akkor tekinthető rendezetlennek, ha legalább 40 aminosav hosszúságú az a folytonos szekvencia részlet, mely a küszöbérték felett van (42, 43).



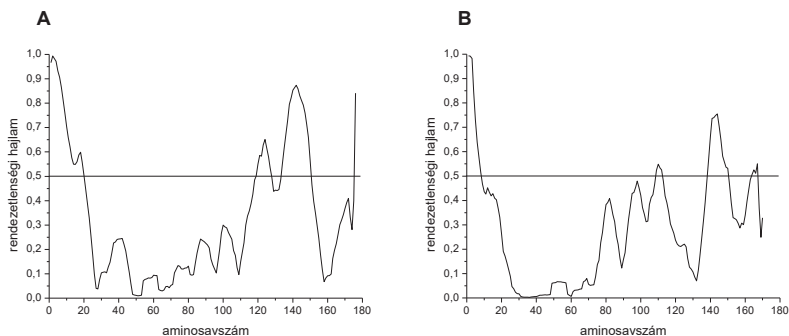
8. ábra: A humán TPPP/p25 rendezetlen régióinak jóslása PONDR programmal

Elvégezve ezt a jóslást azt találtuk, hogy a humán TPPP/p25 tartalmaz egy hosszú, rendezetlen régiót, méghozzá a fehérje N-terminális részén (az első 52 aminosav). A fehérje középső részén egy hasonló hosszúságú (52 aminosavas) rendezettséget mutató régiót jóslott a program, míg a C-terminális részre rövid rendezett és rendezetlen részek váltakozását, ami a jóslást erre a szakaszra bizonytalanná teszi. (ld. 8. ábra) A rendezetlen részek százalékos aránya összességében 46-47%-nak adódott. Hasonlóképpen a szarvasmarha TPPP/p25-re elvégzett jóslás is ezt az eredményt adta. A PONDR jóslás azt tehát egyértelműen megmutatja, hogy a fehérje N-terminális régiója minden valószínűség szerint rendezetlen. További két jósló program, az IUPred (44) és a RONN (45) segítségével is elvégeztük a TPPP/p25 rendezetlenségének jóslását. Az IUPred program az adott aminosav környezetében levő aminosavakra meghatározza a páronkénti kölcsönhatási energiát, ez alapján jóslja meg, hogy az adott aminosav rendezett vagy rendezetlen régióba esik-e. A RONN program pedig ismert feltekeredettségi állapotú (rendezett vagy rendezetlen) fehérjék szekvenciáit tartalmazó adatbázishoz hasonlítja a keresett szekvenciát. A jóslásokat elvégezve mind a két program igen hasonló képet adott: a TPPP/p25 első 40 aminosavas N-terminális részét egyértelműen rendezetlennek mutatták.

Ezen kívül alkalmaztunk egy SCPRED nevű, neurális hálózat alapú programot is, amely segítségével a fehérje aminosav sorrendje alapján lehet következtetni többek között a fehérje betekert ségi állapotára. Ezzel a programmal azokat az aminosavakat lehet megjósolni, melyek részt vesznek az erős hosszú távú kölcsönhatások kialakításában, és ezért „stabilizáló központoknak” is nevezik őket (46). Ezek általában eltemetett hidrofób, ill. aromás oldalláncú aminosavak, de néhány poláris oldalláncú aminosav is fontos szerepet játszhat a stabilizálásban. Elvégezve a jóslást a marha TPPP/p25 esetében nem találtunk stabilizáló központot a PONDR által is rendezetlennek jósolt N-terminális régióban, és a humán TPPP/p25 esetében is csak kettő ilyen aminosavat jósol a program ebben a tartományban (<sup>31</sup>L és <sup>33</sup>L).

Mivel a stabilizáló központok feltételezhetően fontos szerepet játszanak a fehérje 3D szerkezetének kialakításában, illetve a másik oldalról megközelítve megvédik a feltekert szerkezeteket a széteséstől, ezért ezek alulreprezentáltsága szintén arra utal, hogy a TPPP/p25 N-terminális része rendezetlen, hisz nagyon kevés benne az olyan aminosav, mely a merev 3D szerkezetet kialakítsa, ill. stabilizálja. A jósolt stabilizáló központok legtöbbször (75 db) a fehérje középső régiójában helyezkedik el, ami szintén arra utal, hogy ez a régió nagy valószínűséggel rendezettebb.

A PONDR jóslást elvégeztük a TPPP/p20-as és TPPP/p18-as homológokra is. Amint az a 9. ábrán látható, a TPPP/p25 N-terminálisát követő, rendezettnak jósolt régiók jóval kiterjedtebbek a TPPP/p20 és a TPPP/p18 esetén, mint a TPPP/p25-nél. A jóslás adatainak kvantitatív kiértékelése, amelyet a 3. táblázatban foglaltam össze, egyértelműen megmutatja, hogy a TPPP/p25-re jósolt összes rendezetlenség %-ban lényegesen nagyobb, mint a rövidebb homológoknál, különösen, mint a TPPP/p18 esetén.



9. ábra: A TPPP/p20 (A) és a TPPP/p18 (B) rendezetlen régióinak jóslása PONDR programmal

	Aminosav-szám	PONDR által jóslott rendezetlenség		
		Rendezetlen aminosavak száma	Összes rendezetlenség %	Leghosszabb rendezetlen régió (as)
TPPP/p25	219	100	45.7	52
TPPP/p25 N-term. nélkül *	165	53	31.1	20
TPPP/p20	176	47	26.7	20
TPPP/p18	170	31	18.2	15

3. táblázat: A TPPP/p25 és homológjai rendezetlenségének jóslása a PONDR® programmal

\* A TPPP homológok C-terminális részét Pfam05517 domén néven tartalmazza az adatbázis (a TPPP/p25 55-219 aminosavas része), lásd: (54) és <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>.

Mindamellett fontos megjegyezni, hogy a „közös” C-terminális régiókban (az ún. Pfam05517 doménben) is vannak aminosav különbségek, amelyeknek nagy valószínűséggel szerkezeti és funkcionális jelentősége is van, hiszen pl. a TPPP/p18-ban nincsen Trp, a TPPP/p20-ban és a TPPP/p25-ben 1-1 darab van, de nem azonos helyen. Így tehát az eltérő rendezetlenséget valószínűleg nem csupán a rövidebb homológokból hiányzó N-terminális rész tehető felelőssé.

## 2. A rendezetlenség kísérleti kimutatása

Csoportunkban sikerült klónozni és megfelelő mennyiségben izolálni mindhárom humán TPPP fehérjét (38), és így lehetőség nyílt arra, hogy a jóslásokon túl kísérletileg is összehasonlíthassuk és jellemezzük a fehérjék szerkezetét és tulajdonságait.

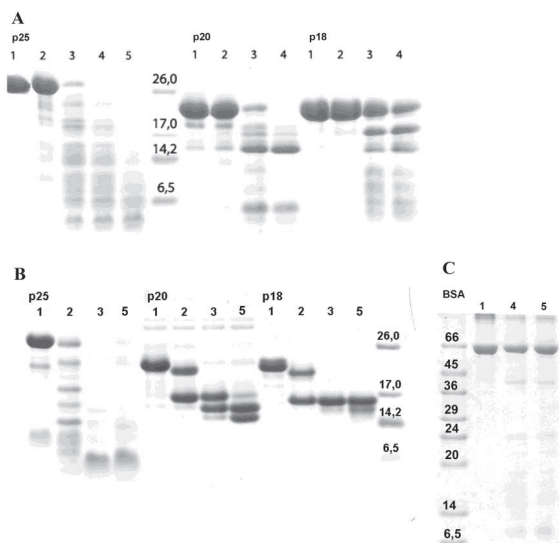
Ennek érdekében különféle biokémiai és biofizikai módszereket alkalmaztam, melyek eredményét alább ismertetem.

### ***Limitált proteolízis***

A proteolízis, azaz a fehérjék enzimes vagy kémiai emésztése, fragmentálása igen érzékeny módszer, amellyel a fehérjék szerkezeti integritására lehet következtetni. Fontana és munkatársai kimutatták, hogy a proteolízis sebességét nem csupán a hozzáférhetőség (felszíni fekvés) határozza meg, hanem a hasítási helyek flexibilitása is (55). Ez alapján nem meglepő, hogy a rendezetlen fehérjék különösen jó szubsztrátjai a proteázoknak, olyannyira, hogy ez a tulajdonság a rendezetlenség egyik kísérleti bizonyítéka. Ez az extrém proteolitikus érzékenység jellemző a bázikus TPPP fehérjékre is (amint azt az Irodalmi áttekintés fejezetben említettem, a TPPP/p25 izoelektromos pontja 9,5-nek adódott, míg a TPPP/p20-é 9,1-nek, a TPPP/p18-é pedig 8,9-nek).

A homológok konformációs tulajdonságainak vizsgálatához Tripszin-IV-et (egy humán agyspecifikus proteázt (56)) és kimotripsint használtam. A három fehérje időfüggő proteolízisének SDS-PAGE képei azt mutatják, hogy (i) a TPPP/p25 2 óra alatt teljesen leemésztődött mindkét proteáz esetében, (ii) a rövidebb homológok mindkét proteázzal szemben kisebb proteolitikus érzékenységet mutatnak: a TPPP/p20 és TPPP/p18 esetén még határozott sávok láthatók 2 óra inkubálás után is, és (iii) a TPPP/p18 mutatja a legkisebb érzékenységet, hiszen az azonos körülmények között végzett tripszin IV-es emésztés esetében a TPPP/p18 fehérje jelentős része (41%-a) sértetlen marad 2 óra után, sőt, még 4 óra után is van intakt fehérje az oldatban (ábra nélkül), míg ez sem a TPPP/p25-ről sem pedig a TPPP/p20-ról nem mondható el. A kimotripsines proteolízis során a globuláris kontrollként használt BSA-nak (szarvasmarha szérum albumin) ugyanezen körülmények között több mint 90%-a natív állapotban maradt a 2 órás kísérlet végén is (10. ábra, C).

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TPPP/p25 szerkezeti integritása (ha van egyáltalán) sokkal gyengébb, mint a rövidebb homológoké, különösen a TPPP/p18-al összehasonlítva. Ezen kívül megállapítható, hogy a teljes TPPP/p25 érzékeny a proteolízisre, és ez az érzékenység nem csupán a rendezetlennek jósolt N-terminális rész lehasíthatóságában merül ki.



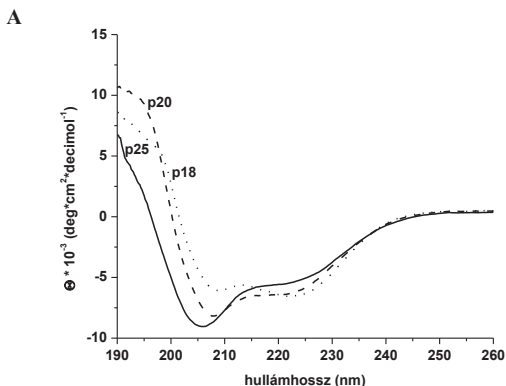
10. ábra: **A:** A TPPP/p25, TPPP/p20 és TPPP/p18 időfüggő limitált proteolízise tripszin IV-el, **(B)** A TPPP/p25, TPPP/p20 és TPPP/p18 időfüggő limitált proteolízise kimotripsinnel, **(C)** A BSA időfüggő limitált proteolízise kimotripsinnel, a TPPP/p25-tel azonos körülmények között végezve a kísérletet. 1. oszlopok: proteáz nélküli, natív fehérjék; 2.-5. oszlopok: emésztési mintázatok rendre 1, 30, 60, és 120 perc után.

### CD mérések

Az oldat fázisú fehérjék másodlagos szerkezetének jellemzésére széleskörűen alkalmazott módszer többek között a távoli-UV CD spektroszkópia, melynek segítségével a különféle másodlagos szerkezeti elemek, így a rendezetlen régiók részarányáról kaphatunk képet.

A TPPP fehérjék másodlagos szerkezetének jellemzésére, illetve a homológok összehasonlításához felvettem a humán rekombináns TPPP/p25, a TPPP/p20 és a TPPP/p18 CD spektrumát a távoli UV tartományban. (11. ábra A) A három TPPP fehérje spektrumának összehasonlító elemzése a TPPP fehérjék másodlagos szerkezetének különbségeire utal, hiszen a spektrumok jelentősen különböznek egymástól. Az  $\alpha$ -hélix tartalomra jellemző, 222nm-nél mérhető negatív ellipticitás a TPPP/p18 esetében a legnagyobb, míg a rendezetlen komponensre utaló negatív csúcs 205-210 nm körül a TPPP/p25 esetén a legerőteljesebb, és ebben az esetben jelentkezik a legkisebb hullámhossznál. A leginkább azonban a TPPP/p18 spektruma különbözik a másik két homológ

esetén mérhető spektrumoktól: ez a spektrum határozott szerkezettel rendelkező, feltekeredett fehérjére jellemző képet mutat. Ezek az adatok jól egyeznek a PONDR jóslással, ami szintén azt valószínűsítette, hogy a legrendezetlenebb homológ a TPPP/p25, a legrendezettebb pedig a TPPP/p18.



**B**

	$\alpha$ -hélix	$\beta$ -redő	$\beta$ -kanyar	rendezetlen
TPPP/p25	18	21	17	44
TPPP/p20	23	23	18	35
TPPP/p18	21	25	18	36

11. ábra: A: a TPPP/p25 (—), a TPPP/p20 (---), és a TPPP/p18 (···) normált távoli UV CD spektruma.

B: A másodlagos szerkezeti elemek aránya a CDPro szoftver dekonvolúciója alapján

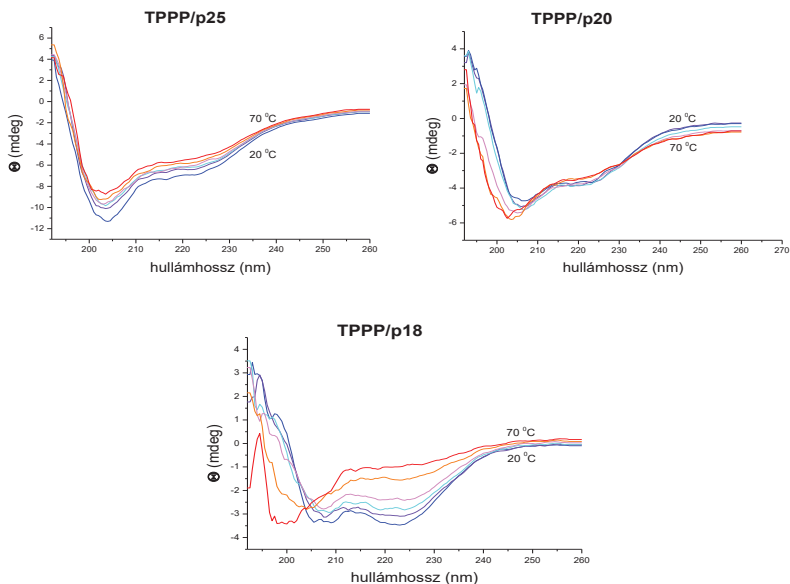
Meghatároztuk a TPPP fehérjékben található másodlagos szerkezeti elemek és rendezetlen részek mennyiségi arányait is, a CDPro (azon belül a CONTINLL) nevű dekonvolúciós szoftvercsomaggal (57). <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/> Ezek a programok különféleképpen összeállított, ismert másodlagos szerkezetű, és így ismert dekonvolúciójú fehérjéket tartalmazó adatbázisok segítségével következtetnek a felbontani kívánt fehérje CD spektrumában található másodlagos szerkezeti elem arányára. Az általunk használt adatbázis 43 szolubilis és 5 denaturált fehérjét tartalmazott.

A számítások alapján a rendezetlen szerkezet aránya a TPPP/p25 esetében 44%, a TPPP/p20 esetében 35%, valamint a TPPP/p18 esetében 36%, ami megerősíti, hogy a rendezetlenség meghatározó elem mindhárom fehérje szerkezetében. Pusztán a dekonvolúciós adatokból (11. ábra

B) látszólag azt a következtetést vonhatnánk le, hogy a TPPP/p20 és TPPP/p18 fehérjék másodlagos szerkezete szinte teljesen azonos. A felvett spektrumaik viszont láthatóan jelentősen különböznek egymástól. Ez is azt mutatja, hogy az ilyen dekonvolúciós programok az analízis során csupán durva közelítést adnak, főleg rendezetlen fehérjék esetében, hiszen az adatbázisban tárolt referencia fehérjék túlnyomórészt globuláris fehérjék, tehát nem minden esetben adnak megbízható támpontot a felbontandó fehérje szerkezetére vonatkozóan.

#### ***A CD spektrumok hőmérsékletfüggése***

Az IUP-k egyik gyakori tulajdonsága a hőstabilitás, hiszen ezen fehérjéknek nincsen olyan merev szerkezete, ami a hőmérséklet emelésével lényegesen megváltozna. A TPPP/p25-ről ismert volt, hogy hőstabil. (1) A többi homológáról azonban ilyen információ még nem állt rendelkezésre. Ezért megmértem a TPPP fehérjék CD-spektrumait a hőmérséklet függvényében. A spektrumokat a távoli UV tartományban (195-260 nm) 20°C és 70°C között vettem fel. A 12. ábrán jól látszik, hogy a legnagyobb hőmérséklet-indukált szerkezeti eltérés a TPPP/p18 esetében figyelhető meg. Ez nem meglepő, hiszen a TPPP/p18 CD spektruma a legrendezettebb a homológok közül.



12. ábra: A homológok CD spektrumainak hőmérséklet-függése a távoli UV tartományban. 20 és 70 °C között 10 fokenként felvett spektrumok. A fehérjekoncentrációk rendre 5,6 3,3 és 3,4  $\mu\text{M}$  a TPPP/p25, a TPPP/p20 és a TPPP/p18 esetében.

A magas hőmérsékleten bekövetkező konformációs változások ellenére a megfigyelt hőmérséklet indukálta kitekeredés mindhárom fehérjénél reverzibilis volt, azaz nem tapasztaltunk számottevő különbséget a CD spektrumok között hőkezelés (15 perc 95 °C-on) előtt és után, ha a spektrumokat egyaránt 20°C-on vettük fel. (ábra nélkül)

### ***CD spektrum 2,2,2-trifluoretanol jelenlétében***

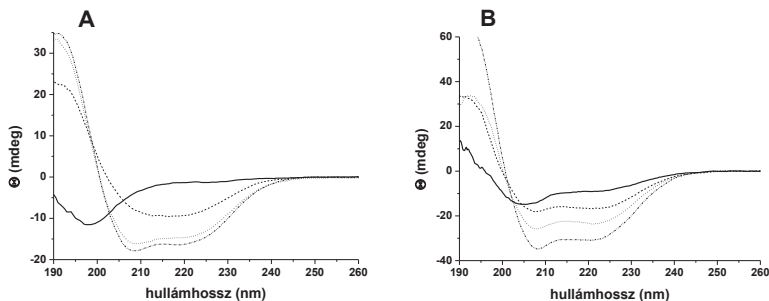
A rendezetlen fehérjék további jellemző vonása, hogy képesek átmenetileg rendezetté válni a kölcsönható partnerükhöz való kötődés révén. A kísérleti adatok azt mutatják, hogy a rendezetlen fehérjék többsége betekeredik a fiziológias partnerhez való kötődés során (58). Megfigyelték, hogy a rendezetlen fehérjék az ilyen, partner által indukált betekeredés során szívesebben képeznek  $\alpha$ -hélixet, mint  $\beta$ -redőt (59).

A TPPP/p25-nek a CD spektruma alapján, a 222 nm-en mért ellipticitásból számított  $\alpha$ -hélix tartalma csak néhány százalék (8), szemben a jóslott adatokkal. (kb. 35 %, ez 4 jóslás átlagából adódik: Garnier: 43,1% (60), Maxfield: 37,6% (61), Qian: 30,3% (62), PHD: 29,8% (63))



A 2,2,2-trifluoetanol (TFE) indukálja és stabilizálja a be nem tekert fehérjék esetében az  $\alpha$ -hélix struktúrák kialakulását, és ezzel tulajdonképpen azt a hidrofób környezetet képes utánozni, amely a rendezett fehérjék hidrofób magjában, vagy a rendezetlen fehérjéknél a fehérje-fehérje kölcsönhatások során figyelhető meg. Ezért széles körben használják arra, hogy olyan fehérjét, ill. fehérjerégiókat mutassanak ki vele, amelyek hajlamosak az ilyen indukált betekeredésre (64, 65). Többek között az IUP-k közé sorolt  $\alpha$ -szinuklein esetében is kiváltható így egy jelentős  $\alpha$ -hélix tartalom növekedés (2%-ról 39%-ra) (66)(ld. 13. ábra A).

Ezek alapján megvizsgáltuk a TFE hatását a TPPP homológok szerkezeti változásaira is. A TPPP/p25 CD spektruma azt mutatta, hogy jelentősen megnő az  $\alpha$ -helicitás (4-ről 43%-ra), ha TFE-t adunk a fehérjéhez, ahogy azt az  $\alpha$ -hélixre jellemző 222 nm-es karakterisztikus minimum növekedése jelezte. (13. ábra B)



13. ábra: TFE hatása  $\alpha$ -szinuklein (A) és TPPP/p25 (B CD spektrumára, 0% (—), 25% (---), 50% (....), 85% (— · — ·) TFE jelenlétében. Az  $\alpha$ -szinuklein koncentrációja 5  $\mu$ M, a TPPP/p25-é 8  $\mu$ M volt.

A TFE használata rávilágít arra, hogy a TPPP/p25 bizonyos körülmények között képes  $\alpha$ -hélixet képezni. Ez a mérés tehát megerősíti, hogy a TPPP/p25 jelentős rendezetlen-rendezett átalakuláson mehet keresztül, mikor kölcsönhatásba kerül a fiziológiás partnere(i)vel.

A tubulin esetében ez a konformáció változás közel sem olyan nagymértékű, bár valamekkora jelváltozás ebben az esetben is megfigyelhető. Ez nem meglepő, hiszen a tubulin egy sokkal rendezettebb, globuláris fehérje. (ábra nélkül)

### ***Egyéb, szerkezeti különbségeket megerősítő mérések***

A differenciál pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC) hasznos információt nyújt a fehérjék térszerkezetének megváltozásáról a hőmérséklet-növekedés hatására bekövetkező termodinamikai változások vizsgálatán keresztül, ugyanis a fehérjék kitekeredését a hőmérséklet emelkedése során pozitív hőkapacitás-változás kísérheti. Mindhárom TPPP homológra az ún. „olvadási hőmérsékletet” ( $T_m$ ) és az olvadás, azaz kitekeredés során bekövetkező entalpiaváltozást ( $\Delta H$ ) detektálva megállapíthatjuk, hogy a TPPP/p25 és a TPPP/p20 hasonló képet mutatnak: az alacsony olvadási hőmérséklet és a viszonylag kicsi entalpiaváltozás a térszerkezetet stabilizáló elemek alacsony előfordulási arányára vagy hiányára utal. (4. táblázat) Szignifikáns hőmérséklet-indukálta szerkezeti változást csak a TPPP/p18 esetében tapasztaltunk (38).

	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal/mol)
TPPP/p25	$56,4 \pm 0,1$	$21 \pm 1$
TPPP/p20	$59,7 \pm 0,1$	$21 \pm 1$
TPPP/p18	$65,1 \pm 0,2$	$85 \pm 2$

4. táblázat: A TPPP homológok DSC-val meghatározott termodinamikai paraméterei

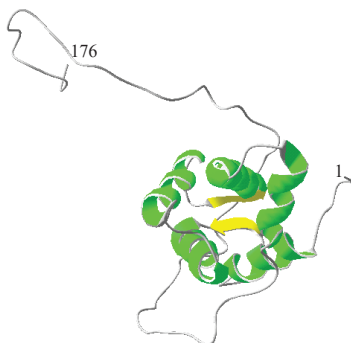
A humán rekombináns TPPP homológok  $^1\text{H}$  NMR spektrumainak összehasonlítása is szignifikáns különbségeket mutat a fehérjék között. A TPPP/p25 esetében a jel kiszélesedésének hiánya arra utal, hogy ez a fehérje nagy valószínűséggel rendezetlen: számos különböző konformer elegye. Ezzel szemben a TPPP/p20, de még inkább a TPPP/p18 határozott szerkezetre utaló spektrumot mutat (38).

A TPPP homológokkal végzett kísérleteink eredményeit összefoglalva tehát elmondható, hogy bár a TPPP fehérjék szekvenciájuk alapján igen jelentős homológiát mutatnak, és egy fehérjecsaládba sorolhatók, mégis igen eltérő szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek.

A fehérjék szerkezetéről megállapítottuk, hogy a TPPP/p25 a legrendezetlenebb, míg a TPPP/p18 a legrendezettebb a homológok közül. Ezt részben a TPPP/p20-ból és a TPPP/p18-ből hiányzó, a TPPP/p25-nél igen rendezetlen N-terminális farok rész okozhatja, de mivel a TPPP/p20 és a TPPP/p18 egymástól is különböznek, ezért nem csupán ez a különbség oka.

Közvetlen és pontos szerkezeti adat azonban ez idáig csak a humán TPPP/p20 szerkezetéről érhető el: Aramini és munkatársai NMR módszerrel határozták meg a fehérje térszerkezetét (Aramini et al. (2007) <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JRF>) (15. ábra)).

A szerkezeti képen jól látszik, hogy a TPPP/p20-nak van egy középső, rendezett magja, amely 5  $\alpha$ -hélixből és 2  $\beta$ -lemezből áll. Ezekhez az N- de még inkább a C-terminális oldalon egyaránt hosszabb, kitekeredett láncok kapcsolódnak. Ez jól egyezik a PONDR által jóslott rövid rendezetlen N-terminális, hosszabb rendezett rész, végül ismét egy rendezetlenebb C-terminális régió hármastagolódással. (ld. 14. ábra)



14. ábra: A humán TPPP/p20 térszerkezete Aramini és munkatársainak NMR mérése alapján. PDB azonosító: 2JRF

A PONDR jóslás és az eddigi kísérleteink is arra utalnak, hogy a TPPP/p25 még a TPPP/p20-hoz képest is flexibilisebb, és/vagy rövidebb a középső, rendezett régió, ill. kiterjedtebbek a terminális rendezetlen régiók. A TPPP/p18 esetében pedig minden bizonnyal kevesebb és/vagy rövidebb rendezetlen régiót tartalmaz a fehérje.

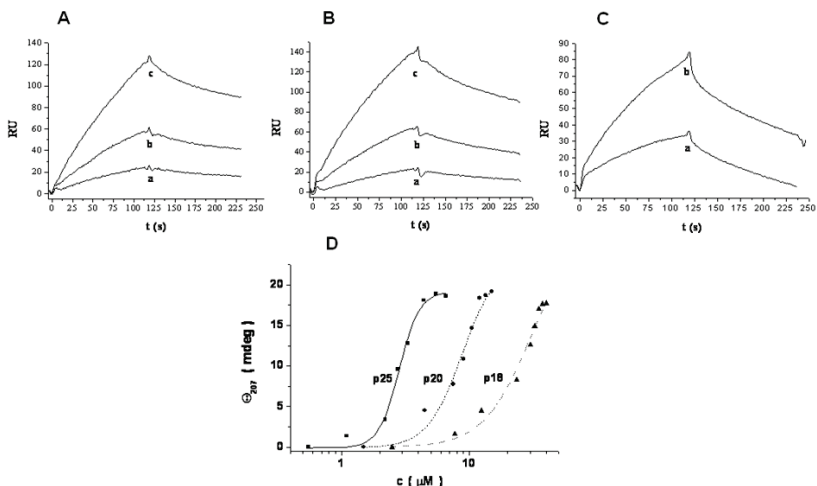
### Funkcióbeli különbségek

A TPPP homológokkal végzett sokrétű vizsgálataink mind arra utalnak, hogy bár elsődleges szerkezetében nagyfokú homológia jellemzi a három fehérjét, másodlagos szerkezetüket tekintve mégis nagy eltérések mutatkoznak. Logikusan adódik tehát a kérdés, hogy ez a szerkezeti különbség vajon befolyásolja-e a funkciójukat?

Mivel a TPPP/p25 elsődleges funkciója alapján tubulin polimerizációt indukál, ezért a kérdés megválaszolásához kutatócsoportunkban elsődlegesen a homológok mikrotubuláris rendszerre kifejtett hatását vizsgáltuk.

A tubulin és a homológok közti kölcsönhatás kimutatására és jellemzésére CD és felületi plazmon rezonancia méréseket végeztünk. Az SPR mérések során mindhárom homológ esetében 900 RU His-tag-es TPPP fehérjét immobilizáltunk Ni-NTA chip felszínére, majd az oldat fázisban különböző mennyiségű tubulint áramoltattunk a felszín felett. (15. ábra A-C). A CD mérések során az adott TPPP homológ, valamint a tubulin egyedi, 207 nm-en mérhető ellipticitásának matematikai összege, és a mindkét fehérjét tartalmazó oldat 207 nm-en mérhető ellipticitása közötti különbségből számítottuk a differencia ellipticitást, mely a 15. D ábrán látható.

Ezen mérések alapján megállapítottuk, hogy mind a TPPP/p20, mind pedig a TPPP/p18 képes kötődni a tubulinhoz, de sokkal gyengébben, mint a TPPP/p25. A kölcsönhatás disszociációs állandója 0,3  $\mu\text{M}$ -nak adódott a TPPP/p25 esetében, 1  $\mu\text{M}$ -nak a TPPP/p20, míg 2,5  $\mu\text{M}$ -nak a TPPP/p18 esetében. (38)



15. ábra: A TPPP fehérjék és a tubulin kölcsönhatása SPR (A-C) és CD (D) mérések alapján.

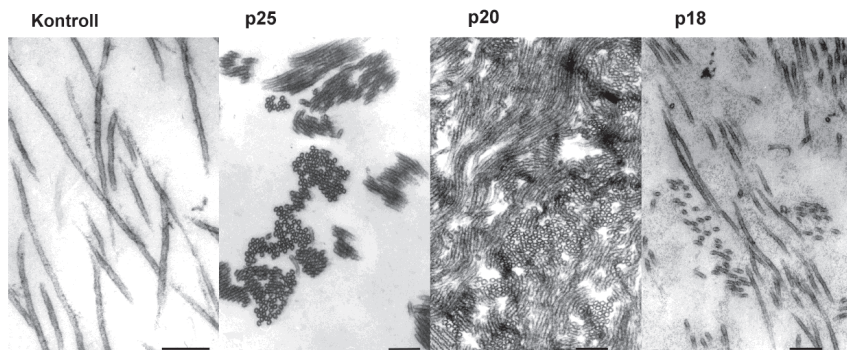
A: TPPP/p25. Tubulin az oldat fázisban: 0,25  $\mu\text{M}$  (a); 0,5  $\mu\text{M}$  (b) és 1  $\mu\text{M}$  (c).

B: TPPP/p20. Tubulin az oldat fázisban: 0,5  $\mu\text{M}$  (a), 1  $\mu\text{M}$  (b) és 2  $\mu\text{M}$  (c).

C: TPPP/p18. Tubulin az oldat fázisban: 1  $\mu\text{M}$  (a) és 2  $\mu\text{M}$  (b)

D: Növekvő mennyiségű TPPP homológok 207 nm-en mérhető differencia ellipticitása 1  $\mu\text{M}$  tubulin jelenlétében.

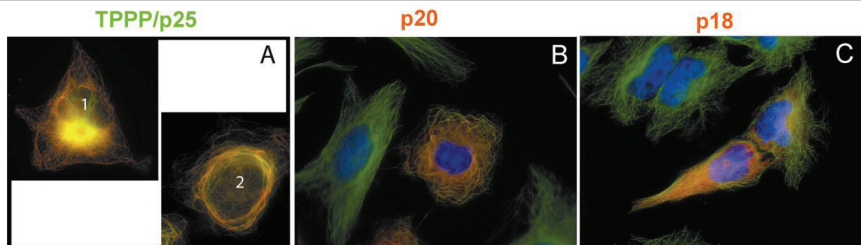
A szedimentációs és a transzmissziós elektronmikroszkóppal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a TPPP/p25 és a TPPP/p20 képes a taxollal stabilizált MT-okhoz kötődni, és a MT szálak kötegelését indukálni, míg a TPPP/p18 nem mutatott ilyen aktivitást. (38)



16. ábra: A TPPP/p25, p20 és p18 hatásának elektronmikroszkópos analízise a taxollal stabilizált MT-ra. A MT kontrol csak taxol hozzáadásával készült. A képeken látható méretjelölő 150 nm-nek felel meg.

*In vivo* a TPPP/p25 sejten belüli lokalizációját TPPP/p25-EGFP fúziós fehérjével tranziensen transzfektált HeLa sejteken vizsgáltuk. A kísérletek azt mutatták, hogy alacsony expressziós szint esetén a TPPP/p25 túlnyomó részt a MT-okkal mutat kolokalizációt anélkül, hogy más ultrastrukturális vagy morfológiai elváltozást okozna. Magas expressziós szint esetén azonban a fúziós fehérje jelentős morfológiai és a MT-rendszer ultrastruktúráját érintő változásokat indukál. Kétféle jellegzetes szerkezet alakul ki: az első egy aggrozóma-szerű csomó (17. A ábra, 1-es sejt), illetve az úgynevezett mag körüli kalitka, „perinuclear cage” (17. A ábra 2-es sejt). Ezen esetekben is megfigyelhető azonban a szoros kolokalizáció a MT-al (67).

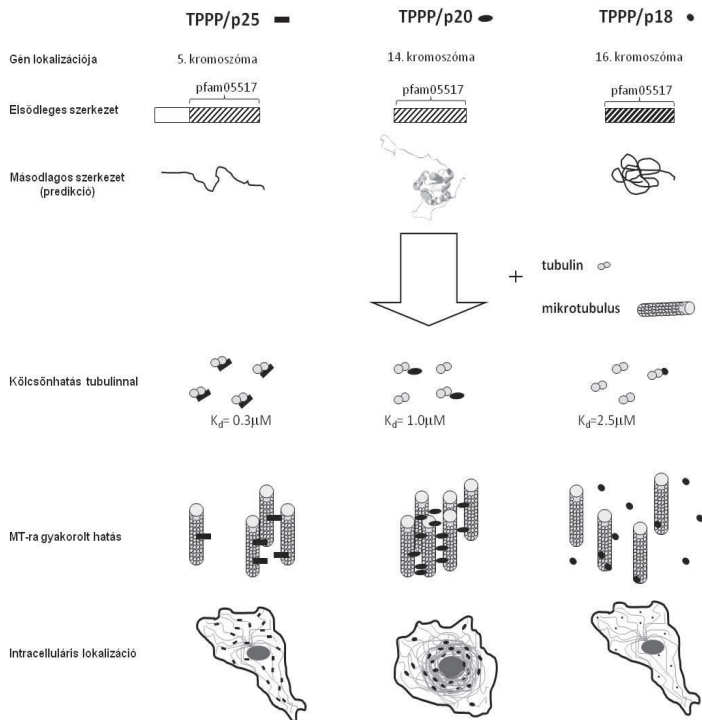
Megvizsgáltuk a TPPP/p20 és a TPPP/p18 sejten belüli eloszlását is, TPPP/p20-pDsRed2, ill. TPPP/p18-pDsRed2 fúziós fehérjékkel. A képeken jól látszik, hogy a TPPP/p20 kiterjedt kötegekbe rendezi a mikrotubuláris rendszert, és a kötegelte MT-ok főként a mag körül csoportosulnak (17. B ábra). A TPPP/p25-tel és a TPPP/p20-szal ellentétben a TPPP/p18 homogén, citoszolikus eloszlást mutat, nem pedig a másik két fehérjére jellemző kolokalizációt a MT-sal (17. C ábra).



17. ábra: A TPPP/p25 (A), TPPP/p20 (B), TPPP/p18 (C) sejten belüli eloszlása.  
A: TPPP/p25 zöld, tubulin piros. B és C: tubulin zöld, TPPP/p20 ill. TPPP/p18 piros.

Kísérleti eredményeink alapján elmondható tehát, hogy a szerkezeti különbségek a három homológ fehérje eltérő funkciójában is megmutatkoznak. Már *in vitro* is jelentős különbség mutatható ki közöttük. Bár mindhárom humán TPPP fehérje kötődik a tubulinhoz, a kölcsönhatás erőssége nagyon különböző: a TPPP/p25 esetén a legerősebb, míg a TPPP/p18-nál a leggyengébb. Ez a különbség *in vivo*, a MT-hoz való kölcsönhatásukat vizsgálva még kifejezettebb, ami a fehérjék eltérő funkciójára utal. Mivel a TPPP/p18 úgy tűnik, nem kolokalizál számottevően a MT-rendszerrel, ez arra enged következtetni, hogy fiziológias körülmények között valószínűleg más fehérje lehet az elsődleges kölcsönható partnere a sejtben.

Összefoglalásul a TPPP fehérjékről szerzett tudásunkat egy sematikus ábrán is szeretném bemutatni:



18. összefoglaló ábra: A TPPP fehérjék jellemzése

## II. Kölcsönható partnerek feltérképezése

A poszt-genomika korszakában a fehérje-fehérje kölcsönhatások kutatása egyre fontosabb a különböző géntermékek funkcióinak, változatos, összehangolt szabályozási hálózatának minél jobb megértéséhez. Ezáltal feltérképezhetjük a sejtek működését, az adott fehérjék fiziológiás, illetve patológiás folyamatokban betöltött szerepét.

Az irodalmi adatok és a kutatócsoportunk korábbi kísérletei alapján ismert volt a TPPP/p25 néhány kölcsönható partnere, mindenekelőtt a tubulin, ill. a MT, mint a fehérje fő célpontja a sejten belül (1, 2). A TPPP/p25-tel foglalkozó korai munkákban leírtak ezen kívül néhány kinázt is, melyekkel kölcsön hat *in vivo*, ill. *in vitro*, és amelyek ezért feltételezhetően befolyásolják a funkcióját (Cdk5 (22, 27), PKA (27), PKC (68)). A közelmúltban találtak néhány további, a TPPP/p25-el kölcsönható fehérjét: a komplexint (69), az  $\alpha$ -szinukleint (36), a mielin bázikus fehérjét (MBP) (70) és a LIM kinázt (71) (ld. 5. táblázat).

Kölcsönható partner	Forrás	Kimutatás módszere	irodalmi hivatkozás	A kölcsönhatás szerepe
<b>[II] Jelátviteli fehérjék</b>				
Glikogén szintáz kináz 3 (GSK3)	patkány	IP	(27)	A TPPP/p25 gátolja a GSK-3 aktivitást
Cdk5	<i>in vitro</i>	foszf.	(22, 27, 72)	Foszforilálja a TPPP/p25-öt, ami ez által nem képes MT-képződést indukálni.
Protein kináz A (PKA)	<i>in vitro</i>	foszf.	(27, 72)	Foszforilálja a TPPP/p25-öt
Protein kináz C (PKC)	marha	IP	(68)	Foszfatidsav-függő módon foszforilálja a TPPP/p25-öt.
LIM kináz	birka	AF, IP	(71)	Foszforilálja a TPPP/p25-öt,
<b>[III] (Pre)szinaptikus fehérjék</b>				
Komplexin	patkány, <i>in vivo</i>		(69)	A kölcsönhatás gyakorisága megnőtt a tanított állatok esetében; $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon.
$\alpha$ -szinuklein	<i>in vitro</i>	ko-szedim.	(36)	együttesen fordul elő a TPPP/p25-el patológiás zárványokban.
<b>[III] Gliális fehérjék</b>				
Mielin bázikus fehérje (MBP)	disznó, marha	AF, IP, CD, FL, SPR	(70)	A TPPP/p25 és a MBP is a differenciálódó oligodendrocitákban fejeződik ki, amikor elérik a mielin-képző állapotukat.

5. táblázat: A TPPP/p25 ismert kölcsönható partnerei

AF: affinitás kromatográfia, IP: immunprecipitáció, CD: cirkuláris dikroizmus, FL: fluoreszcens spektroszkópia, SPR: felületi plazmon rezonancia, foszf.: foszforiláció



Munkám egyik célja volt a TPPP/p25 további kölcsönható partnereinek feltérképezése, hogy a TPPP/p25 funkciójáról a kölcsönható partnereken keresztül minél pontosabb képet kaphassunk. Vizsgálataimat marhaagyból előállított sejtmentes extraktumokkal végeztem, affinitáskromatográfiás módszert alkalmazva.

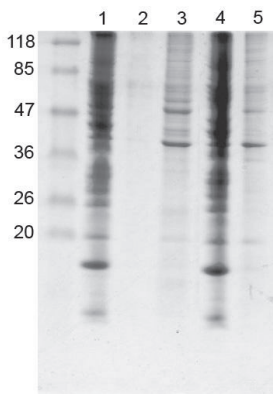
### **Affinitáskromatográfiás vizsgálatok**

A fehérje-fehérje kölcsönhatások feltérképezésének elterjedt módszere az affinitáskromatográfia, melynek során a vizsgálni kívánt célfehérjét kovalensen felkötik egy aktivált Sepharose-gyantára, majd a gyantán különböző fehérjekeverékeket, jellemzően sejt-extraktumot engednek át. A kölcsönható fehérjéket az oszlop megköti, míg az elegy többi komponensét nem. Az oszlopról ezután lemoshatóak a kötődött fehérjék, amelyeket Western blot és/vagy MS/MS módszerrel lehet azonosítani. Vizsgálataimhoz ezt a módszert választottam, mert egyszerűen, szelektíven és viszonylag érzékenyen képes megkötni a kölcsönható fehérjéket, további jelölési és tisztítási lépések nélkül. Hátránya viszont, hogy ha nem specifikusan is képes egy fehérje kötődni a csalifehérjéhez, akkor fals pozitív eredményt adhat, valamint a nagy mennyiségben jelen lévő, a célfehérjével szoros kölcsönhatásban levő partnerek a kisebb mennyiségben jelen lévő, ill. gyengébben kötődő partnert leszoríthatják a gyantáról, így előfordulhat, hogy az elméletileg lehetségesnél kevesebb kölcsönható partnert tudunk azonosítani. Ez azonban a nagy mennyiségben jelen lévő, szorosan kötődő partnerek sejt-extraktumból való szelektív eltávolításával, vagy a körülmények változtatásával kiküszöbölhető. További előnye a módszernek, hogy egyszerre számos kölcsönható fehérje azonosítható, amelyek száma, ill. megoszlása az affinitáskromatográfia körülményeinek változtatásával módosulhat, további információt adva a kölcsönhatásokról (kölcsönhatás erőssége, továbbá pH-tól, ill. egyéb körülménytől való függősége, stb).

Az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon humán rekombináns TPPP/p25-öt immobilizáltam a gyantára, majd az oszlopra sejtmentes marhaagy-extraktumot vittem fel. A nem kötődő fehérjéket mosó pufferrel eltávolítottam, a kötötteket pedig 0,5 M NaCl-ot tartalmazó pufferrel eluáltam. Ugyanezt a kísérletet elvégeztem tubulin-mentesített marhaagy-extraktummal, hogy a fő kölcsönható partner eltávolításával kimutathatóak legyenek a sejtben kisebb mennyiségben jelen lévő esetleges kölcsönható partnerek is. Az így kapott fehérjétartalmú frakciókat megfelelő töményítés után SDS-PAGE segítségével választottam el. A Coomassie

Brilliant Blue festéssel láthatóvá tett csíkokat tömegspektroszkópiás módszerrel azonosították az SzBK Proteomikai Kutatócsoportjában.

A 19. ábra egy tipikus SDS-PAGE képet mutat: az oszlopra felvitt teljes ill. tubulin-mentesített agyextraktumokat, a megfelelő kontrollokat és az oszlopra kikötődött fehérjéket. A kötött frakcióban két intenzív fehérje sáv látható, 50 kDa-nál és 36 kDa-nál, valamint számos kisebb intenzitású sáv. Kontrollként olyan gyantát használtam, melyet az affinitásozloppal megegyező módon, de TPPP/p25 nélkül készítettem és kezeltem. Az így készített „vak” oszlop nem tartott vissza semmit az agyextraktumból, tehát a kötődött fehérjék egyike sem aspecifikusan a gyantához kötődött, hanem specifikusan a hozzá kovalensen kötött TPPP/p25-höz, akár közvetlenül, akár közvetve.



19. ábra: TPPP/p25 affinitás oszlop által kötött fehérjék

1: felvitt citoszolikus extraktum, 2: „vak” gyanta esetében kapott eluátum, 3: a citoszolikus extraktumból kikötődött fehérjék, 4: felvitt tubulin-mentesített extraktum, 5: a tubulin-mentesített extraktumból kikötődött fehérjék

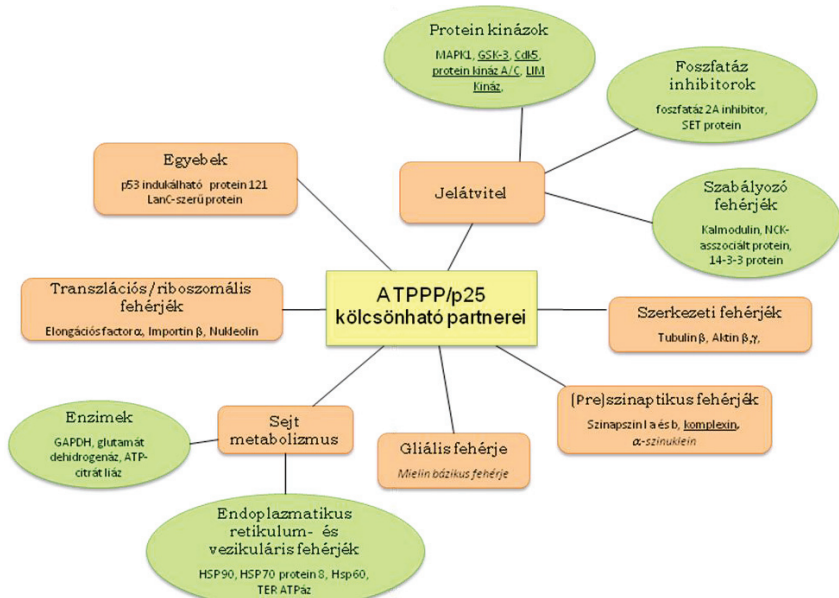
Ezzel a módszerrel 23 fehérjét sikerült azonosítani, köztük nem meglepő módon a régóta elsődleges kölcsönható partnereként ismert tubulint. Ezen fehérjék közül 7 kölcsönhatást más, független módszerrel is sikerült igazolni. (ld. 6. táblázat)

Az újonnan azonosított fehérjék között vázfehérjék, hősokkfehérjék, enzimek, multifunkciós fehérjék, (lipoproteinek) és DNS-hez ill. riboszómához kötődő fehérjék is vannak.

Kölcsönható partner	Módszer	Kölcsönhatás/kölcsönható partner szerepe
<b>[I] Jelátviteli fehérjék</b>		
<b>Protein kinázok</b>		
MAPK 1 (EC 2.7.11.24)	AF, <i>in vitro</i> foszf.	a TPPP/p25 foszforilálása, ami meggátolja a MT képzést
<b>Foszfátáz inhibitorok</b>		
SET protein (PHAP I)	AF	
Foszfátáz 2A inhibitor (PHAP II)	AF	
<b>Szabályozó fehérjék</b>		
Kalmodulin	AF, polim, SPR	Ca <sup>2+</sup> -független kölcsönhatás
NCK-asszociált protein (NAP1)	AF	
14-3-3 protein ( $\gamma$ , $\zeta$ )	AF	
<b>[II] Szerkezeti fehérjék</b>		
Tubulin $\beta$	ko-polim., AF, CD, SPR	a tubulin polimerizációja, a MT-ok kötegelése
Aktin $\beta$ , $\gamma$	AF	
<b>[III] Sejtmetabolizmus fehérjéi</b>		
<b>Enzimek</b>		
GAPDH (EC 1.2.1.12)	AF, IP	patológiás zárványokban együtt fordulnak elő.
Glutamát dehidrogenáz (EC 1.4.1.3)	AF	
ATP citrát liáz (EC 2.3.3.8)	AF	
<b>Endoplazmatikus reticulum és vezikuláris fehérjék</b>		
HSP 90 kDa	AF, IP	
HSP 70 kDa protein 8	AF	
HSP 60 kDa	AF	
TER ATPase	AF	
<b>[IV] (Pre)szinaptikus fehérjék</b>		
Szinapszin I a és b	AF	
$\alpha$ -szinuklein	ko-szedim., AF, ELISA	Patológiás zárványokban együtt fordulnak elő.
<b>[V] Gliális fehérjék</b>		
Mielin bázikus protein	AF, IP	A TPPP/p25 differenciálódott oligodendrocitákban fejeződik ki, amikor azok elérik a mielin-képző állapotot.
<b>[VI] Transzlációs/riboszomális fehérjék</b>		
Elongációs faktor $\alpha$	AF	
Karioferin $\beta 3$ és $\beta 1$ (importin)	AF	
Nukleolin	AF	
<b>[VII] Egyebek</b>		
p53 indukálható protein 121 (CYFIP2)	AF	
LanC-szerű fehérje 1	AF	

6. táblázat: A TPPP/p25 affinitáskromatográfiás módszerrel kimutatott kölcsönható partnerei

AF: affinitás kromatográfia, IP: immunprecipitáció, CD: cirkuláris dikroizmus, FL: fluoreszcens spektroszkópia, SPR: felületi plazmon rezonancia, ko-szedim.: ko-szedimentáció, ko-polim.: ko-polimerizáció, foszf.: foszforiláció



20. ábra: A TPPP/p25 kölcsönható partnerei (saját, saját és irodalmi, valamint irodalmi adatok alapján)

Természetesen minden esetben a kölcsönhatások megerősítése és jellemzése feltétlenül szükséges további független, *in vitro* és *in vivo* módszer(ek)kel is. Eddigi munkám során az alábbi, TPPP/p25-el kölcsönható partnerek jellemzésével foglalkoztam:

## GAPDH

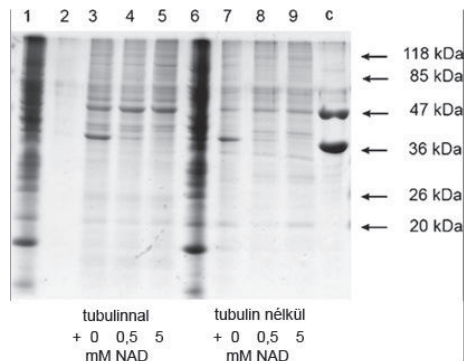
A gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz enzimet sokáig egy klasszikus, ún. „háztartási” (housekeeping) gén által kódolt enzimnek tartották a glikolízisben betöltött szerepe miatt. Manapság egyre több kísérleti bizonyíték utal arra, hogy a GAPDH-nak számos egyéb funkciója is van. Ezeket a funkciókat azáltal tölti be, hogy különféle, a citoplazmában ill. a sejtmagban található fehérjékkel, nukleinsavakkal és sejtorganellumokkal hat kölcsön (73, 74).

A GAPDH-nak a klasszikus, glikolitikus szerepén túl például általános közvetítő szerepe van az apoptotikus kaskádok beindításában (75), és kimutatták, hogy kölcsön hat különböző olyan fehérjékkel is, melyek az öregedéssel összefüggő neurodegeneratív betegségekben vesznek részt,

így például a Huntington-kór, az Alzheimer-kór vagy a különféle ataxiával járó betegségek kialakulásában (76). Nemrégiben kimutatták, hogy mind a GAPDH, mind pedig az  $\alpha$ -szinuklein overexpressziója COS-7 sejtekben Lewy test-szerű citoplazmatikus zárványok kialakulását indukálta (75). Továbbá felmerült az az elgondolás is, hogy az  $\alpha$ -szinuklein önmagában nem elegendő ahhoz, hogy LB-szerű zárványok kialakulását okozza, és különböző járulékos faktorok, mint például az oxidatív stressz, mitokondriális működési zavar, vagy a makromolekuláris kölcsönhatások szintén szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. Ezzel összefüggésben kimutatták például, hogy a PD kialakulásakor a GAPDH stimulálja az  $\alpha$ -szinuklein aggregációt (75). Nemrégiben kimutatták azt is, hogy a TPPP/p25 és a GAPDH együttesen, egyszerre van jelen a rágsálók agyának posztzinaptikus részében (77, 78).

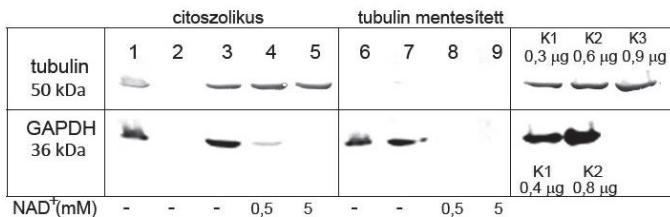
A GAPDH és a tubulin jelenlétét az affinitás oszlopon kötött frakcióban az MS módszer mellett Western-blot technikával is kimutattam (ld. 22. ábra). A kötődött GAPDH mennyisége nem függ jelentős mértékben a felvitt extraktumban jelen levő mikrotubuláris fehérjétől, ill. azok hiányától. Amikor tubulinmentes agyextraktumot vittem fel az oszlopra, a kb. 50 kDa-os fehérjesáv intenzitása a kötött frakcióban jelentősen csökkent, amint az várható volt, (21. ábra, 3. és 7. oszlop) és a tubulinra előhívott Western blot tanúsága szerint tubulint nem tartalmazott. (22. ábra, 6-9 oszlop) Az SDS gélen látható, megmaradt gyenge intenzitású sávot tömegspektroszkópiával a szarvasmarha elongációs faktor 1 alfa (NCBI LOCUS: CAB88863 MW 50 kDa) fehérjeként azonosítottuk.

Ezzel szemben a kötődött GAPDH mennyisége a GAPDH-ra előhívott immunoblot szerint nem változott a kétféle agyextraktum esetében.



21. ábra: A TPPP/p25 affinitás oszlophoz kötött fehérjék SDS/PAGE analízise  
**1 és 6:** felvitt citoszolikus és tubulin-mentes agyextraktumok, **2:** a „vak” gyanta által megkötött fehérjék, **3-5:** a citoszolikus extraktumból kikötődött fehérjék, 0, 0,5 és 5 mM NAD jelenlétében, **7-9:** a tubulin-mentes extraktumból kikötődött fehérjék, 0, 0,5 és 5 mM NAD jelenlétében, **c:** 1,5 µg tubulin és 1,5 µg GAPDH kontroll.

Azért, hogy a TPPP/p25 és a GAPDH közötti kölcsönhatást minél jobban jellemezni lehessen, megvizsgáltam, hogy a kölcsönhatás mennyire érzékeny a  $\text{NAD}^+$  (GAPDH kofaktora) és a sókoncentráció jelenlétére. Ahogy az a 22. ábrán látható, 0,5 mM  $\text{NAD}^+$  jelenléte a GAPDH kötődését jelentősen csökkentette, míg 5 mM  $\text{NAD}^+$  jelenlétében már nem kötődött a GAPDH a TPPP/p25 affinitás oszlophoz.



22. ábra: A TPPP/p25 affinitás oszlophoz kötődött GAPDH és tubulin meghatározása Western blot technikával, NAD jelenlétében  
**1 és 6:** az oszlopra felvitt citoszolikus és tubulinmentes agyextraktumok. **2:** a „vak” gyanta által megkötött fehérjék, **3-5 és 7-9:** kötött frakciók, a felvitt extraktumok rendre 0, 0,5 és 5 mM  $\text{NAD}^+$ -ot tartalmaztak. A géltre felvitt anyagok mennyisége megegyezett az SDS/PAGE-nél leírtakkal (ld. 19. ábra).

150 mM NaCl jelenléte a mosó pufferben már szintén teljesen megszüntette a kölcsönhatást. Ezen kívül nem tapasztaltam GAPDH kötődést abban az esetben sem, ha az agyextraktumhoz 150 mM sót adtam a kötés előtt/alatt (ábra nélkül). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TPPP/p25 és a GAPDH közötti kölcsönhatás érzékeny a  $\text{NAD}^+$  jelenlétére és az ionerőre. Hozzá kell tenni, hogy a tubulin kötődése a TPPP/p25 oszlophoz szintén függött a só jelenlététől, ha nem is olyan mértékben, mint a GAPDH kötődése. Kb. 150 mM só jelenlétében a kötődött tubulin mennyisége is jelentős mértékben lecsökkent, bár a két fehérje kölcsönhatását többféle élő sejtben ki tudtuk mutatni. Kézenfekvő magyarázat lehet a megfigyelésekre az élő sejtekben levő magas fehérjekoncentráció miatt kialakuló ún. „crowding-hatás”, amely köztudottan emeli a fehérjék heteroasszociációs képességét.

Kutatócsoportunkban a GAPDH–TPPP/p25 között kialakuló direkt kölcsönhatást ELISA módszerrel is kimutattuk, ezen kívül a TPPP/p25-tel és az ellene termeltetett antitesttel szarvasmarha agyextraktumokban végzett immunoprecipitációs kísérletek során is igazoltuk (79). Szintén ebben a közleményben mutattuk meg, hogy tranziensen transzfektált HeLa sejtekben alacsony expressziós szint esetén az EGFP-TPPP/p25 fúziós fehérje a mikrotubuláris rendszer mentén helyezkedik el, míg a GAPDH egyenletesen oszlik el a citoplazmában. Magas expressziós szint esetében viszont a GAPDH kolokalizációt mutat a TPPP/p25-el az aggrózómában, amely sejttényeszetekben mimikálja a zárványtest képződést. Az immunhisztokémiai vizsgálataink azt is megmutatták, hogy az  $\alpha$ -szinuklein pozitív Lewy-tesztben a TPPP/p25 mellett a GAPDH is kimutatható, és feldúsul (79). Ez felveti a TPPP/p25 – GAPDH kölcsönhatás patológias jelentőségét.

## MAP kináz 1

A MAPK1, más néven ERK2 egy fontos jelátviteli útvonal részét képezi. A receptorról érkező jelet különböző kinázok közvetítik az ERK2 felé, és foszforilálással aktiválják az enzimet, amely ezután többféle citoskeletális és egyéb fehérjét foszforilál. Ugyanakkor egy fehérjét több kináz is foszforilálhat. Ismert, hogy a MAP-kinázok és a ciklin-dependens kináz 5 (cdk5) is képesek ugyanazt a KSPXK konszenzus-szekvenciát felismerni és foszforilálni, ezáltal befolyásolják egymás működését a különböző idegi funkciók szabályozásakor, így például a tau fehérje foszforilálása során is (80). Ezáltal egy igen bonyolult szabályozó rendszer alakul ki a sejtekben. Mivel a neurodegeneratív betegségek kialakulásában gyakran fontos szerepe van a különféle

rendellenesen foszforilált fehérjéknek, ezért ezeknek a foszforilációs útvonalaknak, illetve ezek finom szabályozásának a megismerése fontos a betegségek patomechanizmusának megértéséhez.

A szarvasmarha agyextraktummal végzett kísérletek során kimutattam, hogy a TPPP/p25 affinitáskromatográfiás oszlopon a MAPK1 a kísérlet körülményei között a kötött frakcióban található. Mivel a foszforiláció, mint poszt-transzlációs módosítás kiemelten fontos a fehérjék működésének szabályozásában, ezért ennek a kölcsönhatásnak a vizsgálata, jellemzése kiemelten fontos a TPPP/p25 fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepének megértéséhez.

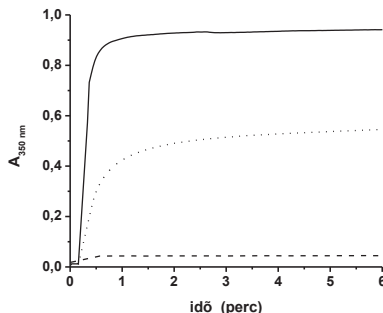
Az első lépés annak az eldöntése, hogy a TPPP/p25 *in vivo* foszforilálva van-e, valamint hogy a két fehérje közvetlenül kötődik-e egymáshoz, vagy esetleg valamely közös, harmadik partneren keresztül történik a kölcsönhatás.

Szarvasmarhából izolált TPPP/p25-öt vizsgálva Dr. Medzihradzsky Katalin laboratóriumában MS módszerrel kimutatták, hogy a TPPP/p25-ben *in vivo* a 14-es Thr, a 18-as Ser és a 32-es Ser foszforilálva van (72). A 32-es Ser KRLS szekvenciájú környezete megegyezik a PKA konszenzusszekvenciájával (81).

A MotifScan nevű motívumkereső programmal (82) végzett analízis több ERK-dokkoló helyet is jósolt a TPPP/p25-ön. Az egyik ezek közül tartalmazza a karakterisztikus LXL motívumot az N-terminális régióban. Ezen túlmenően az ERK2 minimális konszenzusszekvenciája, a Ser/Thr-Pro aminosav kapcsolat 4 helyen is szerepel a TPPP/p25-ben, (14-15, 18-19, 45-46, 160-161), ezek közül a MotifScan program 3 foszforilációs helyet jósol a fehérjén (14-es, 18-as, és 160-as helyen). Ez az eredmény is arra utal, hogy az ERK képes lehet közvetlenül a TPPP/p25-höz kötődni, valamint azt is valószínűsíti, hogy fontos szerepe van a TPPP/p25 Ser/Thr-Pro aminosavakon történő poszt-transzlációs módosításában.

Ezek után nem meglepő, hogy *in vitro* kísérletek során a TPPP/p25-öt sikerült foszforilálni mind a MAPK1-el, mind pedig cdk5-el és PKA-val, továbbá kimutattuk, hogy a foszforiláció funkcionális következményekkel is jár. A foszforiláció meggátolta, hogy a TPPP/p25 kifejtse a tubulin-polimerizációt indukáló hatását: kb. 3 mol P<sub>i</sub> beépülése fehérjénként teljesen meggátolta a polimerizációt (ld. 23. ábra) (72). Ennek a megfigyelésnek kézenfekvő magyarázata lehet, hogy a foszforilált TPPP/p25 nem képes előidézni azt a konformációs változást, ami a tubulin dimerek protofilamentumokká és MT-okká alakulásához szükséges.





23. ábra: Foszforilált és nem foszforilált TPPP/p25-tel indukált polimerizáció 7  $\mu\text{M}$  tubulin polimerizációja 3  $\mu\text{M}$  TPPP/p25-el (—), ill. 3  $\mu\text{M}$  ERK2-vel foszforilált TPPP/p25-el, 2,9 mol P/mol fehérje (····) ill. 1,3 mol P/mol fehérje (---) sztöchiometria esetében.

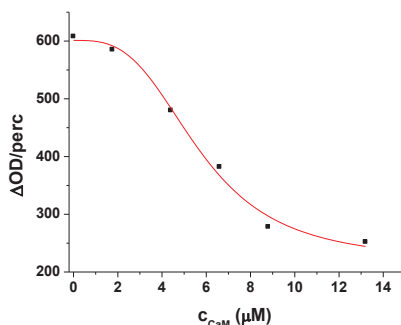
Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a különböző kinázoknak, ezeken belül is elsősorban a MAPK-nak szerepe lehet az agyszövetben a MT rendszer szerveződésére a TPPP/p25 tubulin polimerizációját elősegítő és a MT-kat keresztkötő (kötegelő) hatásán keresztül.

### Kalmodulin

A kalmodulin (CaM) egy  $\text{Ca}^{2+}$  kötő fehérje, mely minden eukarióta sejtben előfordul. Nagyon sok különféle fehérjéhez képes kötődni, ebből adódóan rengeteg sejtfunkciót képes befolyásolni (pl. gyulladásos folyamatokat, metabolizmust, apoptózist, izomösszehúzódást, sejten belüli mozgást, rövid és hosszú távú memóriát, idegsejt növekedést, immunválaszt). Minden sejt típusban megtalálható, és a sejten belüli elhelyezkedése is többféle lehet: a citoplazmában vagy membránkötött formában egyaránt előfordulhat. A CaM képes felszabadítani a raktáraiból a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot. Négy  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő „EF-hand” domént tartalmaz, ezek mindegyike 1-1  $\text{Ca}^{2+}$ -ot képes megkötni. A CaM  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, ún. apo állapotának és a  $\text{Ca}^{2+}$ -mal töltött, aktív állapotának konformációja nagymértékben eltér egymástól:  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás hatására az  $\alpha$ -hélixek közti ún. interhelikális szögek drasztikus változása figyelhető meg.

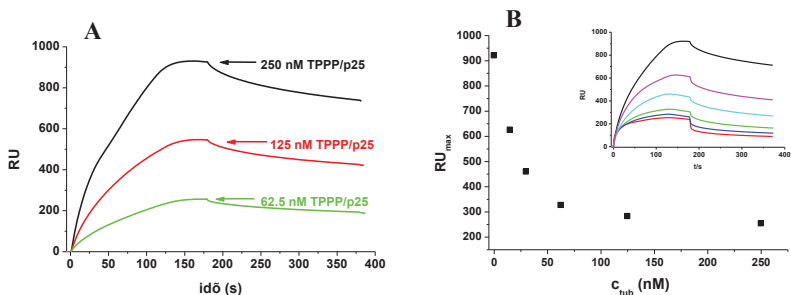
A TPPP/p25 és a CaM kölcsönhatását az affinitáskromatográfias kísérletek során kötődött frakcióból MS/MS méréssel és Western blotlalt is igazoltuk.

Mivel a TPPP/p25 képes indukálni a tubulin heterodimerek MT-sá történő polimerizációját, ezért ezt a kísérleti rendszert is fel lehet használni arra, hogy a TPPP/p25 és a CaM *in vitro* kölcsönhatását kimutassuk. Abban az esetben ugyanis, ha a TPPP/p25 kölcsönhat a CaM-nal és a tubulinnal is, a három fehérjét egyszerre tartalmazó rendszerben a CaM várhatóan befolyásolni fogja a tubulin polimerizációját, jelenléte interferálhat a tubulin TPPP/p25 kölcsönhatással. A CaM-nak a tubulin (TPPP/p25-tel kiváltott) polimerizációjára gyakorolt gátló hatása látható a 24. ábrán. Ez alapján feltételezhető, hogy a jelen lévő CaM verseng a tubulinnal a TPPP/p25-höz való kötődésért, így a növekvő CaM koncentráció gátolja a tubulin polimerizációját.



24. ábra: A CaM hatása a tubulin TPPP/p25 által indukált polimerizációjára (kezdeti sebesség)

A kölcsönhatás jellemzését felületi plazmon rezonancia (SPR) módszer segítségével is elvégeztük, és azt találtuk, hogy a TPPP/p25 kötődik a CaM-al borított felszínhez (25. ábra A). A kölcsönhatás erőssége nem függött a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtól, viszont ha az áramló fázisban a TPPP/p25 mellett CaM is volt, az oldatban levő CaM képes volt leszorítani a TPPP/p25-öt a felszínről, ami a TPPP/p25 és a CaM közvetlen kölcsönhatására utal. Olyan kísérleteket is végeztünk, melyben az immobilizált CaM felszínre konstans mennyiségű TPPP/p25-öt különböző koncentrációjú tubulinnal együtt injektáltunk, és azt tapasztaltuk, hogy a CaM és a tubulin kompetálnak egymással a TPPP/p25-höz való kötődésért (25. B ábra).



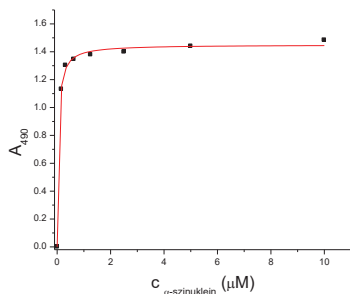
25. ábra: A: Immobilizált CaM felszínre injektált TPPP/p25 SPR görbái B: konstans 250 nM TPPP/p25 kölcsönhatása az immobilizált CaM-al, növekvő tubulin koncentráció jelenlétében.

Ezek a mérések azonban Horváth István doktori értekezésének részét képezik, így itt csak megemlítem, mint a kölcsönhatást alátámasztó és jellemző kísérletet.

### **$\alpha$ -szinuklein**

Az  $\alpha$ -szinuklein a szinuklein fehérjecsalád tagja. Az agyban nagy mennyiségben fordul elő, az idegszövet össz-fehérje tartalmának 1%-át is kiteheti (83). Kisméretű, szolubilis, az SNCA gén által kódolt fehérje, amely patológiás esetben az ún  $\alpha$ -szinukleinopátiák összefoglaló néven nevezett neurodegeneratív betegségekből érintett. (ilyen betegségek a PD, a DLBL és az MSA) Ezen betegségek esetén  $\alpha$ -szinuklein tartalmú, szálas szerkezetű aggregátumok jelennek meg a különböző neuron- és glia populációk citoplazmájában, melyek fontos szerepet játszanak a betegségek patomechanizmusában. Az  $\alpha$ -szinuklein az IUP-k családjába sorolható: rendkívül flexibilis, és számtalan konformációt képes felvenni a környezettől függően, a teljesen rendezetlentől a részlegesen feltekert amiloidogén szerkezeten keresztül a jelentős  $\alpha$ -hélix vagy  $\beta$ -redő tartalmú szerkezetekig (84).

A TPPP/p25 és az  $\alpha$ -szinuklein kölcsönhatását az affinitáskromatográfiát követő MS elemzésen kívül Western-blottal is megerősítettem. Ezen kívül vizsgáltam a két fehérje közvetlen kölcsönhatását ELISA módszerrel is. Ha az egyik vizsgálni kívánt partner ellen termeltetett specifikus ellenanyag rendelkezésre áll, akkor elmondható, hogy ez a módszer gyors, nem igényel túl nagy fehérjemennyiséget, és viszonylagosan olcsó. A vizsgálatot elvégeztem a TPPP/p25 és az  $\alpha$ -szinuklein esetében. A kísérletből meghatározható látszólagos  $K_d$ : 0,1  $\mu$ M-nak adódott.



26. ábra: A TPPP/p25 és az  $\alpha$ -szinuklein kölcsönhatásának vizsgálata ELISA módszerrel. TPPP/p25: a lemezen immobilizálva, blokkolás után  $\alpha$ -szinuklein felező hígítás 10  $\mu$ M-tól.

Ezek az adatok jól kiegészítik, ill. megerősítik a más kutatócsoportok által is megállapított kölcsönhatást (36).

### Mielin bázikus fehérje

A TPPP/p25 kölcsönható partnerei között megtalálható a mielin bázikus fehérje, amely a központi idegrendszerben az idegsejteket körülvevő ún. velőshüvely, más néven mielinhüvely egyik fő fehérjekomponense. A Szklerózis Multiplex egy ismeretlen eredetű, krónikus gyulladásos betegség, amely során ez az axonokat körülvelő velőshüvely-borítás sérül, így különféle súlyos idegrendszeri problémák alakulnak ki. (85) A betegség elnevezése a többszörös (multiplex) heges (szklerózis) területektől származik, amelyek a sok demielinizációs (elpusztult velőshüvelyű) foltot (plakkot) érzékeltetik. A szervezet öngyógyító mechanizmusai a betegséggel szemben tulajdonképpen ennek a mielin-hüvelynek az újrafelépítését célozzák, több-kevesebb sikerrel. Ehhez szükséges egyrészt a velőshüvely-borítást felépítő oligodendrocita sejtek előalakjainak, az ún. oligodendrocita prekursor (OLP) sejteknek a sérült területre vándorlása, valamint ezen sejtek differenciálódása érett, mielinképző oligodendrocitákká. A tartós szövethárosodás hátterében az állhat tehát, ha nincs elegendő prekursor sejt, és/vagy a differenciálódásuk illetve migrációjuk nem megy végbe megfelelően (ld. (86) és az abban foglalt referenciák).

In vivo a TPPP/p25 túlnyomórészt az érett oligodendroglia (OLG) sejtekben fordul elő, valamint oligodendroglialis citoplazmatikus aggregátumokban PD és MSA esetén (23, 87). A TPPP/p25 nagy affinitással kötődik a MBP-hez, és azzal kolokalizál a mielinhüvelyben (70).

Kutatócsoportunkban mutattuk ki először, hogy a TPPP/p25 szintje az OLP sejtekben sokkal alacsonyabb, mint a differenciálódott, érett OLG sejtekben, valamint, hogy a TPPP/p25 expressziója nélkülözhetetlen a prekursor sejtek megfelelő differenciálódásához, azaz a mielinizációhoz/remielinizációhoz szükséges nyúlványok kialakulásához (88). Ez alapján arra következtettünk, hogy a TPPP/p25-nek fiziológiásan az oligodendrociták mikrotubuláris ultrastruktúráinak újrászervezésében és stabilizálásában van szerepe az axonok körüli velőshüvely kialakulása során.

Kutatócsoportunkkal szoros együttműködésben Höftberger és munkatársai immuncitokémiai módszerekkel meghatározták a TPPP/p25 mennyiségét az OLG-kban, SM betegekből származó posztmortem agyszöveti minták esetén (86), és azt találták, hogy a demielinizált sérülésekben kevesebb TPPP/p25-pozitív OLG volt a plakkokban, valamint több TPPP/p25 immunreaktív OLG volt a normálisnak látszó fehérállományban. A remielinizációs folyamatok során a TPPP/p25 immunreaktivitás először az OLG-k citoplazmájában jelent meg, majd később a mielin-hüvelyben is. A legutóbbi kísérleteink tehát arra utaltak, hogy az OLG-k differenciálódási, migrációs és aktiválódási kapacitása is megváltozik a SM kései fázisában, valamint ezek a vizsgálatok felvetették annak a lehetőségét, hogy a TPPP/p25 potenciális markere lehet az SM-nek.

Ez azért is bír kiemelt jelentőséggel, mert jelenleg a SM diagnózisának pontos felállítása nehéz feladat. A betegség tünetei ugyanis igen sokfélék lehetnek, ami megnehezíti az egyéb neurológiai kórképektől való elkülönítését, valamint jelenleg nincs olyan egyszerű vizsgálat, vagy marker, amely segítségével minden kétséget kizáróan, korai fázisban lehetne diagnosztizálni avagy kizárni a betegséget.

Jelenleg a klinikai gyakorlatban használt laboratóriumi eljárások közül a legelterjedtebben használtak azok a meghatározások, amelyek valamilyen IgG frakció nyomát keresik a központi idegrendszerben. A legtöbb esetben ezért a páciensektől liquor-mintát vesznek a gerincvelői folyadék csapolásával és ezt a vérszérummal párhuzamosan vizsgálják. Pozitívnak tekintik azokat a mintákat, amelyeknél két vagy több olyan IgG frakció jelenik meg a liquorban, amely a szérumból nem mutatható ki (oligoklonális gammopátia). Az SM páciensek közel 90 %-ában lehet megfigyelni ezt a jelenséget. Ezen kívül meghatározzák a gerincvelői folyadékból az ún. IgG-indexet, azaz a liquorban lévő IgG mennyiségét a szérumban lévő IgG mennyiségével hasonlítják össze. A liquor IgG szintje ugyanis kétféle ok miatt emelkedhet: egyrészt a központi idegrendszeren belüli IgG többlettermelés miatt (ez jellemző - néhány más betegséggel együtt - az SM-re), vagy a plazmafehérjék liquorba történő átjutása következtében (gyulladás, vagy trauma során). Ez az emelkedett IgG index szintén számos, bár nem minden SM betegre jellemző.

Az egyéb biokémiai markereket tekintve a mielin bázikus fehérje koncentrációját (ill. fragmenseinek koncentrációját) a gerincvelői folyadékban ugyan már régóta a mielinhévely sérülésének diagnosztikai célra felhasználható indikátorának tartják, annak ellenére, hogy egyrészt a MBP szintje a betegség nyugalmi szakaszában nagyon lecsökken az aktív SM-ben mérhetőhöz képest (89), tehát az éppen nyugalmi fázisban levő betegek azonosítására nem igazán használható. Másrészt ez az eljárás nem specifikus a SM-re, mivel a központi idegrendszer egyéb gyulladásos kórképeiben is megemelkedhet a liquor MBP-szintje. A vizsgálatot sokkal inkább egy már megállapított szklerózis multiplex esetében, a betegség aktivitásának becslésére lehet használni.

A laboratóriumi biokémiai vizsgálatok mellett egyre szélesebb körben alkalmazott vizsgálati módszer továbbá az ún. MRI (mágneses magrezonancia pásztázó vizsgálat), amely egy olyan non-invazív képalkotó eljárás, aminek segítségével az agyvelő szerkezetéről kapunk információkat. A kapott képen éppen úgy kimutathatók a régi hegesedések, mint az újonnan keletkezett károsodások. A módszer mind a SM diagnosztizálására, mind a betegség előrehaladásának követésére jól használható. A diagnózis felállítását nehezíti azonban ez esetben is az a tény, hogy önmagában az MRI vizsgálat kb. 5%-os fals negatív eredményt ad, valamint a demielinizációs léziókhoz hasonló világos foltokat eredményezhetnek más neurológiai betegségek is.

Láthatjuk tehát, hogy mindezekig nem ismeretes egyetlen olyan laboratóriumi módszer, vagy klinikai vizsgálati eljárás sem, amelynek pozitivitása egyértelműen bizonyítaná a szklerózis multiplex fennállását.

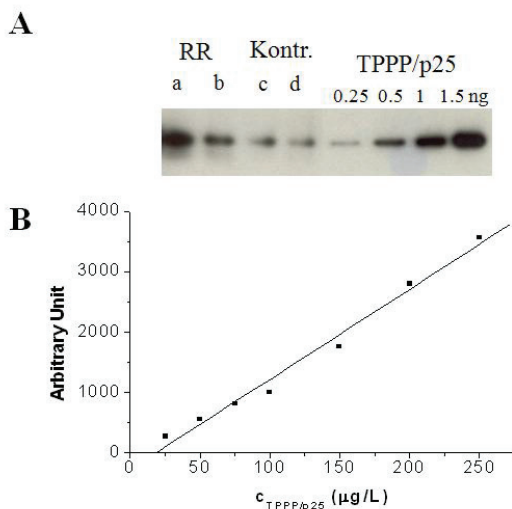
Mivel az immunhisztológiai vizsgálatok a TPPP/p25, mint potenciális marker szerepét felvetették, ezért szerettem volna az autopsziás mintákon kívül egyéb mintákból is kimutatni, valamint kvantitatívan mérhetővé tenni a TPPP/p25 szint SM betegséggel összefüggő változásait.

### **TPPP/p25 a SM betegek gerincvelői folyadékában**

44 SM beteg gerincvelői folyadékából vett minta TPPP/p25 tartalmát vizsgáltam. Ez a 44 beteg két csoport között oszlott meg. 30-an az SM ún. relapszáló-remittáló (RR) formájában szenvedtek, míg 14 beteg az SM ún. klinikailag izolált szindróma (CIS) fázisában volt, azaz esetükben gyakorlatilag a betegség korai fázisában, az első roham(ka)t követően a diagnózis felállításakor vett mintákat vizsgáltam. Kontrollként 32, egyéb, nem autoimmun neurológiai betegségben szenvedő egyén liquor mintáit használtam. Közülük 14 beteg szenvedett egyéb neurológiai betegségben (ENB), 12-en egyéb, nem neurológiai betegségben (EB) és 6-an pedig egyéb, gyulladásos neurológiai betegségben (EGyNB) (részletesebben ld. anyagok és módszerek

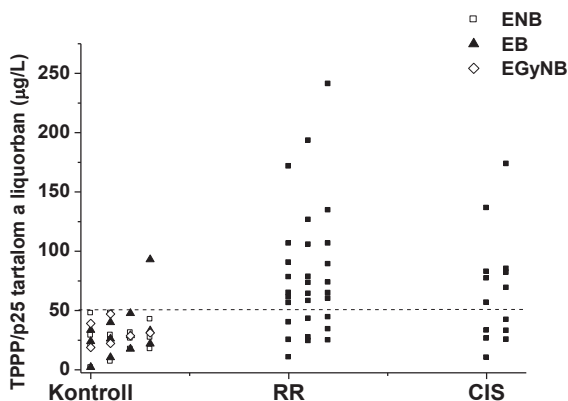
fejezet). A három alcsoport között nincs szignifikáns különbség sem a TPPP/p25 koncentrációkban, sem pedig az interkvartilis terjedelemben. (ld. 28. ábra) Ezért az RR és CIS betegcsoportokat az összes kontroll mintához hasonlítottam.

A mérések során a liquor mintákat SDS gélelektroforézist követően Western blot technikával vizsgáltam: TPPP/p25-re igen specifikus, poliklonális anti-TPPP/p25 ellenanyag felhasználásával, majd kemilumineszcens detektálás segítségével tettem láthatóvá a mintákban található TPPP/p25-öt. Amint az a 27. A ábrán is látszik, kimutatható egy TPPP/p25-szint növekedés az SM betegekben a kontrollokhöz képest.



27. ábra: **A:** Reprezentatív Western blot különböző beteg (a, b) és kontroll mintákból. (c, d); **B:** Kalibrációs görbe ismert koncentrációjú rekombináns humán TPPP/p25 felhasználásával.

Ismert mennyiségű humán rekombináns TPPP/p25-öt kalibrációs kontrollként használva (27. ábra B) a kemilumineszcens előhívást követően a blotok denzitometrlásával kvantitatívvá tettem a minták TPPP/p25 tartalmát. A TPPP/p25 koncentrációja az SM betegek esetében 62,8 (31,2 – 83,1)  $\mu\text{g/L}$ -nek és 64,7 (42,3 – 105,7)  $\mu\text{g/L}$ -nek adódott a CIS és RR csoportokban (*medián* és (interkvartilis terjedelem)) míg a nem-SM betegek esetében ez az érték csak 27,9 (19,9 – 34,9)  $\mu\text{g/L}$  volt. (ld. 28. ábra és 7. táblázat)



28. ábra: A liquorminták TPPP/p25 tartalma, a Western blotot követő kvantitatív kiértékelés alapján. A szaggatott vonal felel meg a szenzitivitás és specificitás értékek alapján meghatározott határértéknek.

	Kontroll	RR	CIS
Betegek száma, <i>db</i>	32	30	14
Nők, <i>db</i> (%)	20 (63%)	24 (80%)	11 (79%)
Kor, évben, <i>átlag</i> (tartomány; SD)	36,9 (19-54; 10,4)	37,9 (18-55; 10,4)	35,9 (18-55; 12,7)
Összfehérje koncentráció, mg/ml, <i>átlag</i> (tartomány; SD)	0,57 (0,17-1,10; 0,18)	0,39 (0,10-0,84; 0,15)	0,43 (0,12-1,13; 0,24)
TPPP/p25 tartalom, µg/L, <i>átlag</i> (tartomány; SD)	29,2 (1,9-93,0; 17,9)	79,0 (10,4-241,1; 52,6)	66,5 (10,1-173,6; 45,4)
IgG index, %-ban, <i>átlag</i> (tartomány; SD)	-	20,7 (0,0-78,0; 22,0)	17,3 (0,0-71,0; 22,7)
Szteroid kezelés, <i>db, átlag</i> (tartomány; SD)	-	1,9 (1-7; 1,4)	0,7 (0-1; 0,5)
EDSS <i>átlag</i> (tartomány; SD)	-	1,9 (0-7; 1,5)	0,1 (0-1; 0,4)

7. táblázat: A beteg és kontroll liquorminták TPPP/p25 tartalma, és néhány klinikai adata

A kapott adatokkal végzett statisztikai elemzés során a Kruskal-Wallis teszt szignifikáns különbséget talált a CIS vagy RR és a nem-SM betegek TPPP/p25 szintjei között ( $\chi^2 = 22,6$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,000012$ ). A csoportokat összehasonlító Mann-Whitney U-teszt segítségével meghatározott  $p$  értékek nem mutattak egyértelmű megkülönböztethetőséget a CIS és RR betegek között ( $p = 0,51$ ), viszont szignifikáns különbség mutatkozott a CIS és a nem-SM ( $p = 0,0032$ ) valamint az RR és nem-SM ( $p = 0,0000039$ ) csoportokat összehasonlítva.



A kvantitatív adatokat alapul véve a 28. ábra is illusztrálja, hogy ha a TPPP/p25 koncentrációja nagyobb, mint 50  $\mu\text{g/L}$ , az nagy valószínűséggel SM-re utal. Ezt a határértéket a specificitási és szelektivitási értékek segítségével határoztuk meg, és nagyjából megfelel a nem-SM betegek esetében mérhető medián kétszeresének. A specificitás, amely a nem-SM populáció helyes azonosításáról ad információt, 97%-os volt, ami azt jelenti, hogy a módszer megfelelően ismeri fel a kontroll (nem-SM) eseteket. A szenzitivitás azonban, amely arra utal, hogy a módszer mennyire ismeri fel az SM eseteket, csak 71%-os volt az RR betegek esetében, és 57%-os a CIS betegek esetében.

Megállapíthatjuk tehát, hogy azok a betegek, akiknél a TPPP/p25 szintje 50  $\mu\text{g/L}$  felett van, potenciálisan érintettek a SM-ben. Így ez a kemilumineszcens Western blot technika diagnosztikai jelentőséggel bír a mielinhüvely sérülésének kimutatására, továbbá az SM betegség indikátorának tekinthető, hiszen a TPPP/p25 feldúsulása független a páciensek nemétől és életkorától, valamint attól is, hogy a pácienseknek éppen van-e a tünetek hirtelen rosszabbodásával járó rohama. Természetesen az elvégzett vizsgálatoknak van néhány korlátja is: először is egyelőre viszonylag kis számú beteget vizsgáltunk meg. Ebből is adódhat, hogy nem sikerült különbséget tenni az RR és a CIS betegek között, holott a betegség előrehaladottságában, súlyosságában van különbség a két csoportba sorolt betegek között. Továbbá nem vizsgáltuk azt a kérdést, hogy a TPPP/p25 feldúsulása specifikus-e a SM betegségre. Ezek a kérdések kijelölik a további kutatás irányát, de nem vitathatjuk azt a tényt, hogy a liquorban mérhető megnövekedett TPPP/p25 szint a SM potenciális diagnosztikus markere.

### ***III. Fehérje-fehérje kötő domének keresése***

A TPPP/p25-nek és kölcsönható partnereinek, elsősorban a tubulinnak, mint elsődleges partnernek, valamint különböző neurodegenerációs folyamatokban bizonyítottan szerepet játszó partner(ek)kel való kölcsönhatás(ok)nak minél pontosabb megismerése és jellemzése azért is igen fontos feladat, mert ezek ismeretében lehetséges olyan gyógyszerjelölt molekulákat kifejleszteni, melyek a kialakuló kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni tudják. Ennek érdekében célul tűzttem ki a TPPP/p25 fehérjén belül a tubulinhoz, valamint az  $\alpha$ -szinukleinhez való kötődésért felelős régió(k) (továbbiakban: kötő régió) meghatározását.

## Tubulin kötő régió azonosítása a TPPP/p25 fehérjén

A kötő régió keresése során homológia keresést és limitált proteolízist követő kötődési (szedimentációs) kísérleteket végeztem, ezen kívül vizsgáltam a TPPP/p25 mesterségesen előállított, N-terminálison csonkolt TPPP/p25( $\Delta$ 3-43) változatának és a TPPP/p20 tubulinhoz való kötődésének jellemzőit, hogy a TPPP/p25 N-terminális farok részének a tubulinhoz való kötődésben játszott szerepét meghatározhassam.

Az eddigi kísérleteink során megállapítottuk, hogy a TPPP/p25 MAP-ként, azaz MT-hoz asszociált fehérjeként viselkedik. A MAP-ek a MT fiziológias funkciójában, ill. annak szabályozásában játszanak szerepet, sok esetben sejt-, ill. szövetspecifikus módon (90). Ilyen MAP a tau fehérje is, ami szintén egy rendezetlen, neurodegenerációs folyamatokban is szerepet játszó fehérje. A szekvencia összehasonlítások alapján kimutatható egy 25 aminosavas homológ szekvencia a két fehérjében, és ez nem más, mint az ún. „tau-MAP binding domain”, a tau MT-hoz kötődéséért felelős régiója (72).

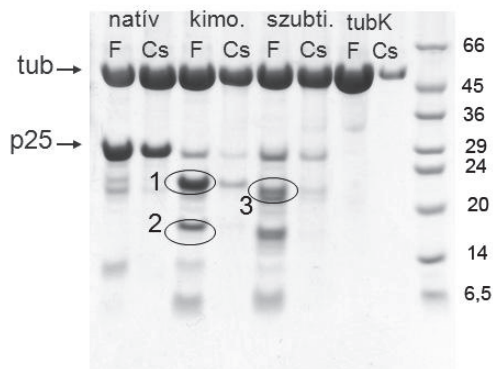
Tau <i>Hs, Bt, Mum</i>	312	V	Q	I	V	Y	K	P	V	D	L	S	K	V	T	S	K	C	G	S	L	G	N	I	H	H	K	P	G	G	Q
TPPP <i>Hs</i>	160	S	P	T	V	S	R	L	T	D	T	T	K	F	T	-	-	-	G	S	H	K	E	R	F	D	P	S	G	K	K
TPPP <i>Bt</i>	159	S	P	T	V	S	R	L	T	D	T	S	K	F	T	-	-	-	G	S	H	K	E	R	F	D	P	S	G	R	G
TPPP <i>Mum</i>	159	S	P	T	V	S	R	L	T	D	T	S	K	F	T	-	-	-	G	S	H	K	E	R	F	D	Q	S	G	K	K

29. ábra: A TPPP/p25 és a tau egyik ismétlődő, MT-kötő régiójának összehasonlítása. *Hs*, *H. sapiens*; *Bt*, *B. taurus*; *Mum*, *M. musculus*. A fekete háttér azonos, míg a szürke hasonló aminosavakat jelöl.

Ez a domén a tauban izoformától függően 3x ill. 4x fordul elő, és 31 ill. 32 aminosavból áll. A Butner és munkatársai kimutatták, hogy ezek az ismétlődő kötő régiók flexibilisek, és egyenként gyenge kötőhelyek, de az ismétlődő régiók számának emelése növeli a tau relatív affinitását a MT-hoz (91). Logikusan felmerül a lehetősége annak, hogy a TPPP/p25-ben is meglevő, a tau kötőhellyel hasonlóságot mutató régió szerepet játszik-e a TPPP/p25 MT-hoz való kötődésében.

A kérdés megválaszolásához azt a stratégiát követtem, hogy a TPPP/p25 kimotripsinnel vagy szubtilizinnel végzett limitált proteolízisével kapott emésztményhez tubulint adtam. Azok az emésztett fragmensek, melyek képesek voltak kötődni a tubulinhoz, és a tubulin polimerizációját/aggregációját elősegíteni, az aggregálódó tubulinnal együtt csapadékot képeztek, amit centrifugálással izoláltam, majd SDS-gélben így nyert fehérje-elegyeket elválasztottam. 3 jól definiált, részlegesen emésztett TPPP/p25 sávot tudtam azonosítani, melyek megjelentek a

csapadék frakcióban. Ezen sávokat MS-el azonosítva megállapítottuk, hogy a TPPP/p25 mely darabjai kötődtek a tubulinhoz.



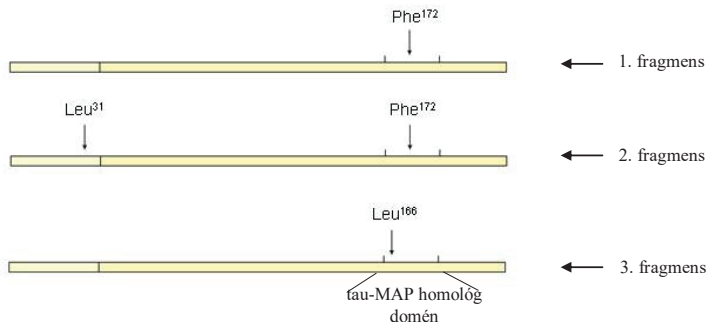
30. ábra: Kimotripsinnel és szubtilizinnel limitáltan emésztett TPPP/p25 kötődése tubulinhoz. (TPPP/p25: 1 mg/ml, emésztőenzim: 5 µg/ml, leállítás: 1 mM PMSF hozzáadásával, 5 perc után) F: felülúszó, Cs: csapadék. Natív: a két fehérje emésztőenzim nélkül, tubK: tubulin kontroll, TPPP/p25 nélkül

	F	Cs	aminosav rész
Natív TPPP/p25	59	41	1-219
1. fragmens (kimotr.)	85	15	1-172
2. fragmens (kimotr.)	97	3	32-172
3. fragmens (szubtil.)	90	10	1-166

8. táblázat: az egyes fragmensek százalékos megoszlása denzitometrálas alapján

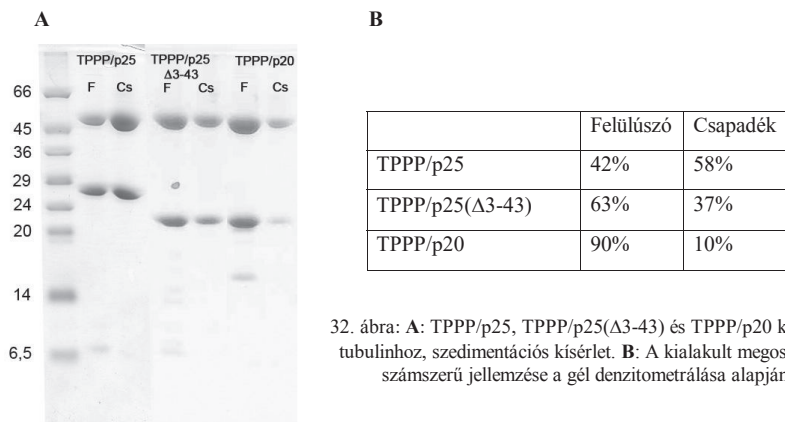
Így sikerült megállapítani, hogy az 1-es fragmens megoszlást mutatott a tubulinhoz kötött valamint a nem kötődött, felülúszó frakciók között: túlnyomó részt ugyan a felülúszóban maradt, de még láthatóan képes volt kötődni a tubulinhoz, hiszen a csapadék frakcióban is megjelent (ld. 30. ábra). Erről a fragmensről az elvégzett MS/MS vizsgálat megmutatta, hogy ez a fehérje 1-172-es fragmense. A tau-MAP homológ domén a TPPP/p25 163-187-ig terjedő szakasza, tehát látható, hogy itt a kimotripszin keresztbe vágja a feltételezett kötő régiót (ld. 31. ábra és 8. táblázat). A 2-es fragmens az 1-es fragmenstől annyiban különbözik, hogy ebben az esetben az N-terminális farokrész is majdnem teljesen hiányzik már a fehérjéből, és látható, hogy így ez a darab (33-172) szinte már nem is képes kötődni a tubulinhoz. A szubtilizines emésztés nagyon hasonló képet mutatott, csak a szubtilizin néhány aminosavval előrébb, a 166-os leucin után hasít bele a

fehérjébe. Látható, hogy a 3-as fragmens az 1-es fragmensnél is gyengébben kötődik. Ez az eredmény is megerősíti, hogy a tau-MAP homológ domén szerepet játszik a TPPP/p25-tubulin kötődésben is. Emellett az is látható, hogy az erősen bázikus és rendezetlen N-terminális farokrész is fontos a kölcsönhatás során.



31. ábra: A kimotripszes és szubtilizines emésztés sémája

Annak jellemzésére, hogy a TPPP/p25 N-terminális farokrésze milyen szerepet játszik a tubulinhoz való kötődésben, összehasonlítottam a natív TPPP/p25, az N-terminálisán csonkolt TPPP/p25 ( $\Delta 3-43$ ) és a TPPP/p20 felülúszóban-, ill. csapadékban mérhető megoszlási arányát a szedimentációs kísérlet során, hiszen azonos körülmények között a tubulinhoz adva ezeket a fehérjéket jellemezhetjük az adott fehérje polimerizáló képességét.



32. ábra: A: TPPP/p25, TPPP/p25( $\Delta 3-43$ ) és TPPP/p20 kötődése tubulinhoz, szedimentációs kísérlet. B: A kialakult megoszlások számszerű jellemzése a gél denzitometrálosa alapján.

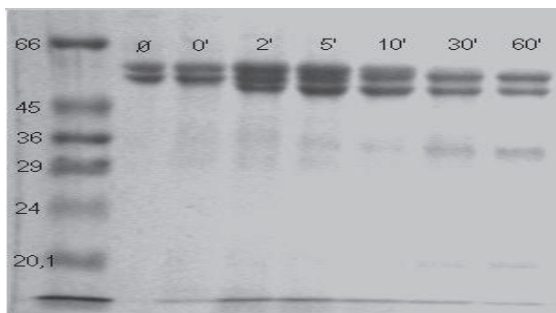
Látható, hogy az N-terminális régiót nem tartalmazó TPPP/p25( $\Delta$ 3-43) kevésbé kerül a csapadék frakcióba, és kevesebb tubulint képes ugyanolyan körülmények között polimerizálni, mint a natív TPPP/p25. A TPPP/p20 pedig még a TPPP/p25( $\Delta$ 3-43)-nál is kevésbé kötődik illetve polimerizál. (ld. 32. ábra) Ez a kísérlet is arra utal, hogy van ugyan szerepe a TPPP/p25 rendezetlen, N-terminális farokrészének a tubulinhoz való kötődésben, és így a polimerizáló funkció kifejtésében, de a közös, pfam-domén részen lévő aminosavcserék is nagymértékben befolyásolják a kialakuló kötődés erősségét.

### **TPPP/p25 kötő régió azonosítása a MT-on**

Annak feltérképezésére, hogy a tubulin/MT mely szegmense felelős a TPPP/p25 megkötéséért, szintén limitált proteolízises kísérleteket végeztem. Mivel a TPPP/p25 elsődleges célpontja *in vivo* a MT hálózathoz, ezért a MT-hoz való kötődés vizsgálata gyakorlatban is fontos információkkal szolgálhat a fiziológiás ill. patológias funkció megismeréséhez.

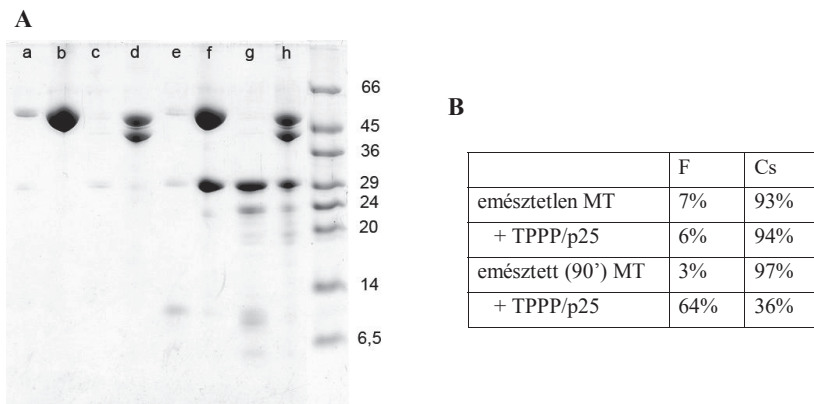
A taxollal polimerizált MT-t szubtilizinnel emésztettem, mert a szubtilizin az  $\alpha$ -tubulin 438-as Asp és a  $\beta$ -tubulin 433-as Gln aminosava után hasít, levágva egy kb. 20 aminosavas részt mindkét alegység felszínéről „kilógó” C-terminális farok részekből (92). Mivel a tubulin C-terminális farok része savas karakterű, a TPPP/p25 pedig bázikus fehérje, ezért feltételezhető, hogy a keresett kötő régió a farok rész, vagy annak egy része lehet. Ez a feltételezés már csak azért is logikusan adódik, mert ez a rész a MT „külső” felszínén van, és több fehérjének is kötőhelye, amint azt Al-Bassam és munkatársai kimutatták (14). Többek között a MAP2c és a tau fehérje is ehhez a C-terminális régióhoz kötődik.

Ezt a limitált proteolízist elvégezve a 33. ábrán látható, hogy az emésztés éppen annyira ment végbe, hogy a szubtilizin mindkét alegység C-terminális végét lehasította, viszont a fehérje rendezettebb, belső régióiba még nem hasított bele.



33. ábra: A MT emésztése szubtilizinnel. Ø: az enzimet még nem tartalmazó MT; 0', 2', 5', 10', 30', 60' pedig rendre a megadott idő utáni mintavételek.

A kapott, fark nélküli MT-hoz TPPP/p25-öt adva a TPPP/p25 megjelenik a pellet frakcióban, tehát még képes kötődni az emésztett MT-hoz is (ld. 34. ábra). Látható ugyanakkor, hogy sokkal gyengébb ez a kölcsönhatás, mivel a TPPP/p25 jelentős része már a felülúszóban marad.



34. ábra: **A:** a,b: emésztetlen MT; c,d: MT 90' emésztés után; e,f: emésztetlen MT+TPPP/p25; g,h: 90' emésztés utáni MT+TPPP/p25; Felülúszók: a, c, e, g; Csapadékok: b, d, f, h. **B:** Az e-h mintákban kialakult megoszlások számszerű jellemzése a gél denzitometrállása alapján.

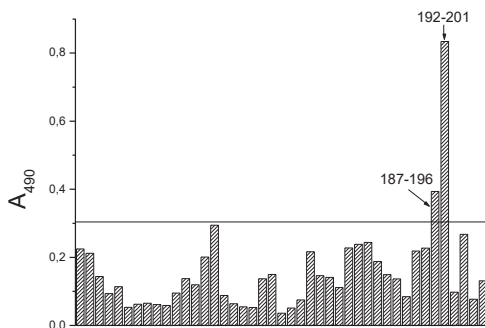
Összességében tehát megállapítható, hogy a TPPP/p25 nagy valószínűséggel a MT-on felszínre kerülő, C-terminális régiójához kötődik, hasonlóan a tauhoz és a MAP2c-hez, de nem csupán az

utolsó, kb. 20 aminosavból álló hipervariábilis részhez, hiszen ha azt szubtilizinnel eltávolítottam, a TPPP/p25 még mindig képes volt a MT-hoz kötődni, igaz, már csak kisebb mértékben.

### **$\alpha$ -szinuklein kötő régió a TPPP/p25-ön**

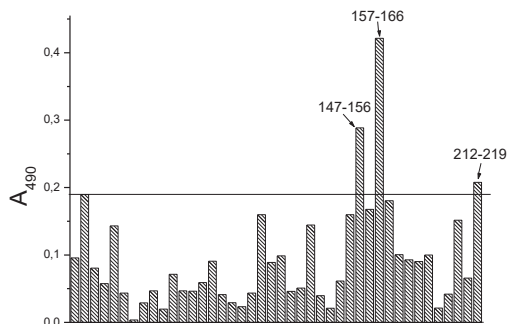
A következő lépésben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a TPPP/p25 mely régiójához kötődik az  $\alpha$ -szinuklein? A kérdés megválaszolásához az ún. „Pepscan” módszert használtam. Ezt a módszert eredetileg ellenanyagok epitópmeghatározására dolgozták ki, és a lényege, hogy polietilén ”tühegyek”-re kovalensen kötve egymással átfedő, kb. 10 tagú peptidket szintetizálnak úgy, hogy a kérdéses fehérje (antigén) teljes szekvenciáját lefedjék vele. Amelyik peptidszakasz az adott ellenanyag epitópja, ott kölcsönhat az IgG a tühegyen levő peptiddel, tehát a tühegyhez kikötődik, és ez megfelelő másodlagos ellenanyaggal kimutatható (93).

A TPPP/p25 esetében 5-ös átfedésű, 10 tagú peptidket szintetizáltak, Dr. Magyar Anna kutatócsoportjában, az ELTE-n. A módszer validálását ismert epitópú TPPP/p25 ellenanyaggal végeztük. A TPPP/p25 186-204-ig terjedő peptidje ellen termeltetett ellenanyaggal végezve a kísérletet látható, hogy amint azt vártuk, a legerősebb jelet a 192-201-es peptid adta: több mint 2x akkora jelet, mint a limit-érték, ami az egész lemez átlagos elnyelésének kétszerese (ld. 35. ábra). Az ezzel átfedő, 187-196-os peptid is a limit-érték feletti, bár sokkal gyengébb jelet adott. Megállapíthatjuk tehát, hogy a módszer működik, és megfelelően alkalmazható a TPPP/p25 esetében.



35. ábra: A TPPP/p25 peptidok kölcsönhatása ismert epitópú TPPP/p25 ellenanyaggal

Ezek után a tühegyeket először  $\alpha$ -szinukleint tartalmazó oldattal inkubáltam. Amelyik TPPP/p25 peptid felelős a kölcsönhatásért, az képes lesz kikötni a szinukleint. A lemezt anti  $\alpha$ -szinukleinre specifikus ellenanyaggal előhívva az látszik, hogy a TPPP/p25 kb. 147-166-ig terjedő szakasza játszik nagy valószínűséggel szerepet az  $\alpha$ -szinuklein kötésében. A megállapított limit-érték feletti, bár sokkal gyengébb jelet adott a 212-219-es peptid is, de ez valószínűleg egy fals pozitív jel, mert egyéb, a tühegyekkel végzett kísérletek során is gyakran hasonló mértékű jelet adott, a kísérlet típusától függetlenül.



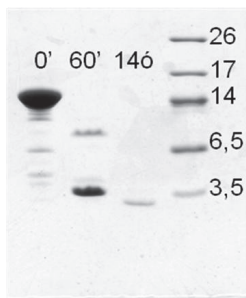
36. ábra: a TPPP/p25 peptidek kölcsönhatása  $\alpha$ -szinukleinnel

### TPPP/p25 kötő régió azonosítása az $\alpha$ -szinukleinen

Mivel a TPPP/p25 fő molekuláris célpontjának számító tubulin mellett a TPPP/p25 és az  $\alpha$ -szinuklein között kialakuló kölcsönhatás a neurodegeneratív folyamatokban játszott patológiás szerepük miatt kiemelten fontos, ezért ebben az esetben is meghatároztam, hogy az  $\alpha$ -szinukleinen hol található a TPPP/p25-öt kötő domén. Ehhez ismételtlen a limitált proteolízist követő kötődési kísérleteket hívtam segítségül.

A tripszin 15 helyen képes az  $\alpha$ -szinukleint hasítani. A legutolsó lehetséges hasítási hely a 102-es aminosav után van. Azaz a fehérje utolsó, C-terminális és igen savas karakterű, 38 aminosavból álló darabja (103-140) szükségképpen intakt marad. Ez a peptid Tris-tricin SDS gélen látható (37. ábra, 146. minta).

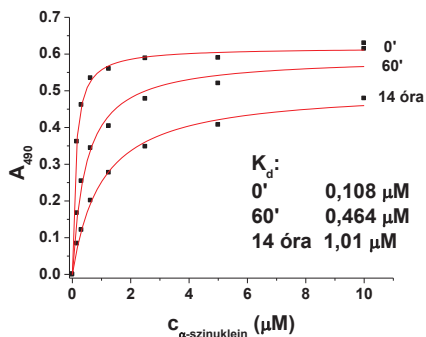




37. ábra: Az  $\alpha$ -szinuklein emésztése tripszinnel

Egy speciális ellenanyaggal, amely a fragmensen belül a 111-132-ig terjedő szakaszt ismeri fel, a különböző kísérletek során ennek a fragmensnek a jelenléte igazolható. Ezt kihasználva többféle ELISA kísérletet végeztem:

Először az ELISA lemezt TPPP/p25-el borítottam, majd natív  $\alpha$ -szinukleint, ill. emésztett  $\alpha$ -szinukleint adtam hozzá, különböző koncentrációban. Ez után a lemezt az említett  $\alpha$ -szinuklein-ellenanyaggal hívtam elő. A kísérletből egyértelműen látszik, hogy a p25 képes megkötni az emésztett  $\alpha$ -szinukleint is, bár a látszólagos  $K_d$  sokkal gyengébb kölcsönhatásra utal (ld. 38. ábra).

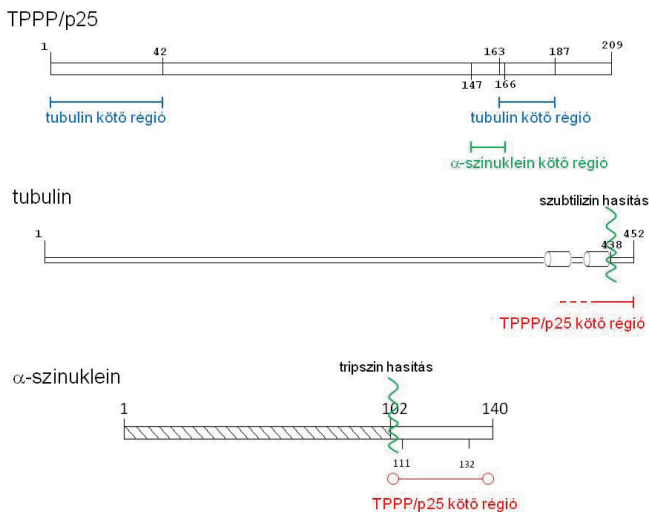


38. ábra Natív ill. emésztett  $\alpha$ -szinuklein kötődése TPPP/p25-höz

Ezt a kísérletet különböző NaCl koncentrációknál elvégezve az tapasztaltam, hogy bár a só jelenléte gyengíti a TPPP/p25 –  $\alpha$ -szinuklein kölcsönhatást, még 500 mM NaCl jelenlétében is képes mind a natív, mind a fragmens kötődni a TPPP/p25-höz (ábra nélkül).

Ezen kísérletek alapján megállapítható, hogy az  $\alpha$ -szinuklein C-terminális, 102-140-ig terjedő szakasza képes kötődni a TPPP/p25-höz, a kötő régiót tehát ezen belül kell feltételeznünk.

A TPPP/p25-nek és kölcsönható partnereinek kölcsönhatásokért felelős kötő régióiról szerzett ismereteinket foglalja össze az alábbi sematikusan ábra:



39. összefoglaló ábra: A TPPP/p25-nek és kölcsönható partnereinek kölcsönhatásért felelős régiói

Megállapítottam tehát, hogy a TPPP/p25 163-187-ig terjedő szakasza, mely az ún. tau-MAP kötő doménnel homológ, fontos szerepet játszik a TPPP/p25 tubulinhoz való kötődéséért. Ezen kívül az N-terminális farokrész hozzájárul a kölcsönhatás kialakításához. A TPPP/p25 peptidokkal és  $\alpha$ -szinukleinnel végzett Pepscan kísérletek tanúsága szerint ezen kölcsönhatás kialakulásáért a TPPP/p25 147-166-ig terjedő szakasza felelős. A tubulin-TPPP/p25 kölcsönhatást vizsgálva megállapítottam, hogy a TPPP/p25 nagy valószínűséggel a tubulin felszíni, C-terminális régiójához kötődik, de nem csupán az utolsó, kb. 15 aminosavból álló hipervariábilis részhez, hanem valószínűleg egy annál hosszabb régióhoz. Végül az  $\alpha$ -szinuklein – TPPP/p25 kölcsönhatás

tekintetében elmondható, hogy az  $\alpha$ -szinuklein rendezetlen, C-terminális, 102-140-ig terjedő szakasza képes kötődni a TPPP/p25-höz, a kötő régiót tehát itt kell feltételeznünk.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A társadalom előregedésével a neurodegenerációs betegségek egyre súlyosabb egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. Kialakulásuk során általában egy eredendően rendezetlen, vagy valamilyen hatás következtében megváltozott szerkezetű fehérje aberráns kölcsönhatásokat hoz létre, ami zárványtestek kialakulásához, majd az idegszövet károsodásához vezet. A kutatócsoportunkban azonosított TPPP/p25 egy igen flexibilis, stabil 3D szerkezettel nem rendelkező fehérje, amely Parkinson-kór és egyéb szinukleinoopátiák esetében a neuronális és gliális zárványokban halmozódik fel. Elsődleges fiziológiás célpontja a mikrotubuláris rendszer: *in vitro* indukálja a tubulin polimerizációját, és transzfektált emlős sejtekben a MT hálózattal kolokalizál. Doktori munkám során (nukleinsav-, ill. fehérje szinten) azonosítottam és klónoztam 2 rövidebb, a TPPP/p25-höz hasonló fehérjét, a TPPP/p20-at és a TPPP/p18-at. Mindhárom TPPP fehérje szerkezeti és funkcionális sajátosságait különböző biofizikai és biokémiai módszerekkel jellemeztem. Kimutattam, hogy bár a TPPP fehérjék szekvenciájuk alapján jelentős homológiát mutatnak, és egy fehérjecsaládba sorolhatók, mégis igen eltérő szerkezeti és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek: a különböző predikciós módszerek és az elvégzett kísérletek alapján (CD, limitált proteolízis, differenciál pásztaázó kalorimetria, <sup>1</sup>H-NMR) megállapítottam, hogy a homológok közül a TPPP/p25 a legrendezetlenebb, míg a TPPP/p18 a legrendezettebb. Ezt a különbséget részben a TPPP/p20-ból és a TPPP/p18-ből hiányzó, a TPPP/p25-ben pedig igen rendezetlen N-terminális farok rész okozza, de mivel a TPPP/p20 és a TPPP/p18 egymástól is jelentősen különböznek, ezért nem csupán ez a különbség oka. A TPPP/p25 kölcsönható partnereinek feltérképezése során 23 fehérjét azonosítottam, közülük 7 kölcsönhatást (pl. GAPDH, CaM, MAPK1,  $\alpha$ -szinuklein, tubulin, HSP90, mielin bázikus fehérje) más, független módszerrel is sikerült igazolni, illetve további kísérletekkel a kialakuló kölcsönhatásokat jellemezni, ezáltal jobban megismerni a TPPP/p25 fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepét. Kimutattam, hogy a TPPP/p25 potenciális biomarkere a Szklerózis Multiplex betegségnek: a betegek liquormintáiban megemelkedik a TPPP/p25 koncentrációja. Megállapítottam, hogy a TPPP/p25 – tubulin, ill. az  $\alpha$ -szinuklein – TPPP/p25 kölcsönhatásokban a kölcsönható fehérjék mely szakasza(i) játszanak fontos szerepet. A kötő régiók ismeretében nyíltak lehetőség olyan gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztésére, melyek a kialakuló kölcsönhatásokat szelektíven befolyásolni tudják, aminek különösen a patológias folyamatok esetében van nagy jelentősége.

## SUMMARY

With the aging of society, neurodegenerative diseases are causing more serious health and social problems. During the development of neurodegeneration intrinsically unfolded or for some reason misfolded proteins form aberrant protein-protein interactions resulting in protein aggregates in inclusion bodies and this ultimately leads to neuronal damage.

In our research group we isolated a flexible protein termed Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25 (TPPP/p25) which has no well-defined 3D structure. This protein is enriched in pathological neuronal and glial inclusions, characteristic for Parkinson's Disease and other synucleinopathies. Physiologically the primary target of this protein is the microtubule system: *in vitro* induces tubulin polymerization, and co-localizes selectively with MTs in transfected eukaryotic cells

In my Ph.D. thesis I have identified and then cloned 2 shorter protein homologues of TPPP/p25, namely TPPP/p20 and TPPP/p18. Structural and functional properties were characterized all three cases of TPPP proteins with different biophysical and biochemical methods. I've demonstrated that the TPPP proteins show a high degree of homology, and they could be considered as a new protein family. However experiments (CD spectroscopy, limited proteolysis, differential scanning calorimetry and  $^1\text{H}$  NMR) showed significant structural differences among them: while TPPP/p25 is a flexible and inherently dynamic protein, TPPP/p18 rather than TPPP/p20 shows a stable structure. These structural differences cannot be attributed exclusively to the disordered N-terminal region of TPPP/p25: it's missing from both TPPP/p20 and TPPP/p18, but the major structural difference occurs between TPPP/p20 and TPPP/p18. During searching possible physiological interacting partners of TPPP/p25, 23 proteins were identified. In 7 cases (GAPDH, CaM, MAPK1,  $\alpha$ -synuclein,  $\beta$ -tubulin, HSP 90, Myelin basic protein) the interactions were corroborated by independent methods, and the functional significance the interactions were further characterized. The TPPP/p25 concentrations were found to be significantly higher in the liquor samples of Multiple Sclerosis (MS) patients than in that of non-MS ones. Thus the TPPP/p25 can be helpful diagnostic marker for MS. Amino acid sequences responsible for TPPP/p25 and tubulin or TPPP/p25 and  $\alpha$ -synuclein interaction were identified. Information on the interacting surfaces could help to develop lead compounds influencing these interactions selectively, which has great importance in the case of pathological processes.

## A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK:

1. Orosz F, Kovács GG, Lehotzky A, Oláh J, Vincze O, Ovádi J. (2004)  
„TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments.”  
Biol Cell. **96** (9) 701-11.
2. Vincze O, Tőkési N, Oláh J, Hlavanda E, Zotter Á, Horváth I, Lehotzky A, Tirián L, Medzihradsky FK, Kovács J, Orosz F, Ovádi J (2006)  
„TPPP proteins: members of a new family with distinct structures and functions”  
Biochemistry **45** (46) 13818-13826
3. Oláh J, Tőkési N, Vincze O, Horváth I, Lehotzky A, Erdei A, Szájli E, Medzihradsky FK, Orosz F, Kovács GG, Ovádi J (2006)  
„Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies”,  
FEBS Letters **580** (25) 5807-5814
4. Hlavanda E, Klement É, Kókai E, Kovács J, Vincze O, Tőkési N, Orosz F, Medzihradsky F. K, Dombrádi V, Ovádi J (2007)  
„Phosphorylation Blocks the Activity of Tubulin Polymerization-promoting Protein (TPPP), Identification of sites targeted by different kinases”  
JBC **282** (40) 29531–29539
5. Vincze O, Oláh J, Tőkési N, Zádori D, Klivényi P, Vécsei L, Ovádi J  
„Enrichment of a new myelin protein, TPPP/p25 in CSF is a potential marker of Multiple Sclerosis”  
(publikálás alatt)

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Hlavanda E, Kovacs J, Olah J, Orosz F, Medzihradsky KF, & Ovadi J (2002) *Biochemistry* **41**, 8657-8664.
2. Tirian L, Hlavanda E, Olah J, Horvath I, Orosz F, Szabo B, Kovacs J, Szabad J, & Ovadi J (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13976-13981.
3. Kovacs GG, Laszlo L, Kovacs J, Jensen PH, Lindersson E, Botond G, Molnar T, Perczel A, Hudecz F, Mezo G, *et al.* (2004) *Neurobiol Dis* **17**, 155-162.
4. LeDuc PP & Bellin RR (2006) *Ann Biomed Eng* **34**, 102-113.
5. Schliwa M, van Blerkom J, & Porter KR (1981) *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4329-4333.
6. Oakley BR (2000) *Trends Cell Biol* **10**, 537-542.
7. Downing KH & Nogales E (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**, 16-22.
8. Chen YH, Yang JT, & Martinez HM (1972) *Biochemistry* **11**, 4120-4131.
9. Unger E, Bohm KJ, & Vater W (1990) *Electron Microsc Rev* **3**, 355-395.
10. Unger E, Bohm KJ, Muller H, Grossman H, Fenske H, & Vater W (1988) *Eur J Cell Biol* **46**, 98-104.
11. Bohm KJ, Vater W, Steinmetzer P, & Unger E (1990) *Eur J Cell Biol* **51**, 33-37.
12. Rodionov VI & Borisov GG (1997) *Science* **275**, 215-218.
13. Mitchison T & Kirschner M (1984) *Nature* **312**, 237-242.
14. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, & Milligan RA (2002) *J Cell Biol* **157**, 1187-1196.
15. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, & Hirokawa N (1992) *Nature* **360**, 674-677.
16. Hirokawa N (1998) *Science* **279**, 519-526.
17. Liliom K, Wagner G, Pacz A, Cascante M, Kovacs J, & Ovadi J (2000) *Eur J Biochem* **267**, 4731-4739.
18. Morejohn LC (1994) *Plant Cell* **6**, 1696-1699.
19. Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, & Banerjee M (2008) *Med Res Rev* **28**, 155-183.
20. Mekhail TM & Markman M (2002) *Expert Opin Pharmacother* **3**, 755-766.
21. Kumar N (1981) *J Biol Chem* **256**, 10435-10441.
22. Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Sato K, Omori A, Sato S, Shiratsuchi A, Uchida T, & Imahori K (1991) *FEBS Lett* **289**, 37-43.
23. Takahashi M, Tomizawa K, Fujita SC, Sato K, Uchida T, & Imahori K (1993) *J Neurochem* **60**, 228-235.
24. Shiratsuchi A, Sato S, Oomori A, Ishiguro K, Uchida T, & Imahori K (1995) *Biochim Biophys Acta* **1251**, 66-68.
25. Seki N, Hattori A, Sugano S, Suzuki Y, Nakagawara A, Muramatsu M, Hori T, & Saito T (1999) *J Hum Genet* **44**, 121-122.
26. Liliom K, Wagner G, Kovacs J, Comin B, Cascante M, Orosz F, & Ovadi J (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 605-610.
27. Martin CP, Vazquez J, Avila J, & Moreno FJ (2002) *Biochim Biophys Acta* **1586**, 113-122.
28. Lopez R, Silventoinen V, Robinson S, Kibria A, & Gish W (2003) *Nucleic Acids Res* **31**, 3795-3798.
29. Uversky VN (2002) *Protein Sci* **11**, 739-756.

30. Wright PE & Dyson HJ (1999) *J Mol Biol* **293**, 321-331.
31. Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, & Obradovic Z (2002) *Biochemistry* **41**, 6573-6582.
32. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, *et al.* (2001) *J Mol Graph Model* **19**, 26-59.
33. Fink AL (2005) *Curr Opin Struct Biol* **15**, 35-41.
34. Uversky VN (2002) *Eur J Biochem* **269**, 2-12.
35. Tompa P (2002) *Trends Biochem Sci* **27**, 527-533.
36. Lindersson E, Lundvig D, Petersen C, Madsen P, Nyengaard JR, Hojrup P, Moos T, Otzen D, Gai WP, Blumbergs PC, *et al.* (2005) *J Biol Chem* **280**, 5703-5715.
37. Na GC & Timasheff SN (1986) *Biochemistry* **25**, 6222-6228.
38. Vincze O, Tokesi N, Olah J, Hlavanda E, Zotter A, Horvath I, Lehotzky A, Tirian L, Medzihradsky KF, Kovacs J, *et al.* (2006) *Biochemistry* **45**, 13818-13826.
39. Gopalakrishna R & Anderson WB (1982) *Biochem Biophys Res Commun* **104**, 830-836.
40. Bradford MM (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-254.
41. Schagger H & von Jagow G (1987) *Anal Biochem* **166**, 368-379.
42. Li X, Romero P, Rani M, Dunker AK, & Obradovic Z (1999) *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **10**, 30-40.
43. Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, & Dunker AK (2001) *Proteins* **42**, 38-48.
44. Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, & Simon I (2005) *Bioinformatics* **21**, 3433-3434.
45. Yang ZR, Thomson R, McNeil P, & Esnouf RM (2005) *Bioinformatics* **21**, 3369-3376.
46. Dosztanyi Z, Fiser A, & Simon I (1997) *J Mol Biol* **272**, 597-612.
47. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, *et al.* (2001) *Ann Neurol* **50**, 121-127.
48. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, *et al.* (2005) *Ann Neurol* **58**, 840-846.
49. Orosz F & Ovadi J (2008) *FEBS Lett* **582**, 3757-3764.
50. Thompson JD, Higgins DG, & Gibson TJ (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
51. Zhang Z, Wu C, Huang W, Wang S, Zhao E, Huang Q, Xie Y, & Mao Y (2002) *J Hum Genet* **47**, 266-268.
52. Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, & Lin W (2000) *Genome Res* **10**, 703-713.
53. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16899-16903.
54. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res* **32**, D138-141.
55. Fontana A, Polverino de Laureto P, De Filippis V, Scaramella E, & Zamboni M (1997) *Fold Des* **2**, R17-26.
56. Katona G, Berglund GI, Hajdu J, Graf L, & Szilagyi L (2002) *J Mol Biol* **315**, 1209-1218.
57. Sreerama N & Woody RW (2000) *Anal Biochem* **287**, 252-260.
58. Dyson HJ & Wright PE (2002) *Curr Opin Struct Biol* **12**, 54-60.



59. Fuxreiter M, Simon I, Friedrich P, & Tompa P (2004) *J Mol Biol* **338**, 1015-1026.
60. Garnier J, Osguthorpe DJ, & Robson B (1978) *J Mol Biol* **120**, 97-120.
61. Maxfield FR & Scheraga HA (1976) *Biochemistry* **15**, 5138-5153.
62. Qian N & Sejnowski TJ (1988) *J Mol Biol* **202**, 865-884.
63. Rost B (1996) *Methods Enzymol* **266**, 525-539.
64. Hua QX, Jia WH, Bullock BP, Habener JF, & Weiss MA (1998) *Biochemistry* **37**, 5858-5866.
65. Gupta P, Khan RH, & Saleemuddin M (2003) *Arch Biochem Biophys* **413**, 199-206.
66. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, & Lansbury PT, Jr. (1996) *Biochemistry* **35**, 13709-13715.
67. Lehotzky A, Tirian L, Tokesi N, Lenart P, Szabo B, Kovacs J, & Ovadi J (2004) *J Cell Sci* **117**, 6249-6259.
68. Yokozeki T, Homma K, Kuroda S, Kikkawa U, Ohno S, Takahashi M, Imahori K, & Kanaho Y (1998) *J Neurochem* **71**, 410-417.
69. Nelson TJ, Backlund PS, Jr., & Alkon DL (2004) *Hippocampus* **14**, 46-57.
70. Song YJ, Lundvig DM, Huang Y, Gai WP, Blumbergs PC, Hojrup P, Otzen D, Halliday GM, & Jensen PH (2007) *Am J Pathol* **171**, 1291-1303.
71. Acevedo K, Li R, Soo P, Suryadinata R, Sarcevic B, Valova VA, Graham ME, Robinson PJ, & Bernard O (2007) *Exp Cell Res* **313**, 4091-4106.
72. Hlavanda E, Klement E, Kokai E, Kovacs J, Vincze O, Tokesi N, Orosz F, Medzihradszky KF, Dombradi V, & Ovadi J (2007) *J Biol Chem* **282**, 29531-29539.
73. Mazzola JL & Sirover MA (2002) *Neurotoxicology* **23**, 603-609.
74. Ovadi J, Orosz F, & Hollan S (2004) *Mol Cell Biochem* **256-257**, 83-93.
75. Tsuchiya K, Tajima H, Kuwae T, Takeshima T, Nakano T, Tanaka M, Sunaga K, Fukuhara Y, Nakashima K, Ohama E, *et al.* (2005) *Eur J Neurosci* **21**, 317-326.
76. Sirover MA (1999) *Biochim Biophys Acta* **1432**, 159-184.
77. Li KW, Hornshaw MP, Van Der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, Jimenez CR, Gouwenberg Y, Gundelfinger ED, Smalla KH, *et al.* (2004) *J Biol Chem* **279**, 987-1002.
78. Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, & Neubert TA (2004) *Mol Cell Proteomics* **3**, 857-871.
79. Olah J, Tokesi N, Vincze O, Horvath I, Lehotzky A, Erdei A, Szajli E, Medzihradszky KF, Orosz F, Kovacs GG, *et al.* (2006) *FEBS Lett* **580**, 5807-5814.
80. Sharma P, Veeranna, Sharma M, Amin ND, Sihag RK, Grant P, Ahn N, Kulkarni AB, & Pant HC (2002) *J Biol Chem* **277**, 528-534.
81. Alfthan K, Heiska L, Gronholm M, Renkema GH, & Carpen O (2004) *J Biol Chem* **279**, 18559-18566.
82. Naughton BT, Fratkin E, Batzoglou S, & Brutlag DL (2006) *Nucleic Acids Res* **34**, 5730-5739.
83. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, & Saitoh T (1995) *Neuron* **14**, 467-475.
84. Uversky VN (2003) *J Biomol Struct Dyn* **21**, 211-234.
85. Lassmann H, Bruck W, & Lucchinetti CF (2007) *Brain Pathol* **17**, 210-218.

86. Hofberger R, Fink S, Aboul-Enein F, Botond G, Olah J, Berki T, Ovadi J, Lassmann H, Budka H, & Kovacs GG (2010) *Glia* **58**, 1847-1857.
87. Kovacs GG, Gelpi E, Lehotzky A, Hofberger R, Erdei A, Budka H, & Ovadi J (2007) *Acta Neuropathol* **113**, 153-161.
88. Lehotzky A, Lau P, Tokesi N, Muja N, Hudson LD, & Ovadi J (2010) *Glia* **58**, 157-168.
89. Cohen SR, Herndon RM, & McKhann GM (1976) *N Engl J Med* **295**, 1455-1457.
90. Umeyama T, Okabe S, Kanai Y, & Hirokawa N (1993) *J Cell Biol* **120**, 451-465.
91. Butner KA & Kirschner MW (1991) *J Cell Biol* **115**, 717-730.
92. Redeker V, Melki R, Prome D, Le Caer JP, & Rossier J (1992) *FEBS Lett* **313**, 185-192.
93. Geysen HM, Melen RH, & Barteling SJ (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3998-4002.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Ovádi Juditnak, egyrészt azért, mert lehetővé tette, hogy az általa vezetett kutatócsoportban dolgozhassak, másrészt azért, hogy folyamatosan figyelemmel és tanácsokkal kísérte munkámat. Köszönöm, hogy együtt dolgozhattam Hlavanda Emmával, aki szeretettel és türelemmel megtanított a szakma gyakorlati alapjaira. Hálás vagyok a csoport minden tagjának, köztük Oláh Juditnak, Zotter Ágnesnek, Lehotzky Attilának és Horváth Istvánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel. Külön köszönöm Orosz Ferencnek és Oláh Juditnak a figyelmes és értő lektorálást.

Köszönet illeti Dr. Erdei Anna professzorasszony által vezetett kutatócsoportot a TPPP/p25 ellenanyagok előállításáért, Dr. Kovács János professzor urat az elektronmikroszkóppal készített képekért, Dr. Magyar Annát a TPPP/p25 peptidek szintetizálásáért, Dr. Vécsei László és Dr. Klivényi Péter professzor urakat a liquor mintákért és az inspiráló együttműködésért, valamint a Dr. Medzihradsky Katalin vezette SzBK Proteomikai Laboratóriumot a számtalan tömegspektroszkópiás mérés kivitelezéséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családom, azon belül elsősorban szüleim és férjem támogatását és biztatását, hiszen nélkülük nem készülhetett volna el ez a dolgozat.